
**CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIALEN FUNKTION IN
HERZ- UND SKELETTMUSKEL WÄHREND DER ENTWICKLUNG
EINER DURCH CHRONISCH ERHÖHTE NACHLAST INDUZIERTEN
HERZINSUFFIZIENZ**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Andrea Schrepper
geboren am 24.04.1982 in Merseburg

Gutachter

1. Prof. Dr. Torsten Doenst, Jena
2. Prof. Dr. Regine Heller, Jena
3. PD Dr. Volker Adams, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03. September 2013

Abkürzungsverzeichnis

A	Geschwindigkeit des aktiven Einstroms
A'	Myokardbewegung während des aktiven Einstroms
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ANT	Adeninnukleotidtranslokase
ATP	Adenosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BN-PAGE	Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis
BNP	Brain Natriuretic Peptide
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CS	Citratsynthase
CSR	Citratsynthase Quotient
DNP	Dinitrophenol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DT	Dezelerationszeit
E	Geschwindigkeit des passiven Einstroms
E'	Myokardbewegung während des passiven Einstroms
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ERR α	Estrogen-related receptor alpha
ESV	Endsystolisches Volumen
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FS	Fractional Shortening
Gastro/Gas	Gastrocnemius
Glu	Glutamat
Hom	Homogenat
HR	Herzrate
IFM	interfibrillare Mitochondrien
K	Komplex
LVEDD	Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser

LVESD	Linksventrikulärer Endsystolischer Durchmesser
LVHW	Linksventrikuläre Hinterwand
LVVW	Linksventrikuläre Vorderwand
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
MTPT	Mitochondrial permeability transition pore
MW	Mittelwert
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NRF	Nuclear Respiratory Factor
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PCWP	Pulmonary Capillary Wedge Pressure
PGC-1 α/β	Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PPAR α/γ	Peroxisome-proliferator-activated receptor
Pyr	Pyruvat
RC	Respiratorische Kapazität
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SSM	subsarkolemmale Mitochondrien
Succ	Succinat
TAC	Transverse Aortenkonstriktion
Tfam	Transcription factor A, mitochondrial
TNF α	Tumor necrosis factor
TR β	Thyroid hormone receptor

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	7
1 Einleitung	9
1.1 Mitochondrien	11
1.2 Atmungskette	13
1.3 Regulation der mitochondrialen Biogenese	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Tiere	17
2.1.2 Geräte	17
2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Medikamente	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Chirurgische Eingriffe	19
2.2.2 Echokardiografie	20
2.2.3 Organentnahme und Herstellung der Muskelhomogenate	21
2.2.4 Isolation der Mitochondrien	22
2.2.5 Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität	24
2.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford	26
2.2.7 Bestimmung der respiratorischen Kapazität	26
2.2.8 Messung der spezifischen Komplexaktivitäten	31
2.2.9 RT-PCR	35
2.2.10 Immunoblot	37
2.2.11 Blau-Native Gelelektrophorese	39
2.2.12 Durchflusszytometrie	40
2.2.13 Statistische Auswertung	40
3 Ergebnisse	42
3.1 Morphometrische Parameter	42
3.2 Echokardiografische Parameter	43

3.3	Morphometrie der Skelettmuskulatur	49
3.4	Mitochondriale Funktion	50
3.4.1	Gehalt an mitochondrialem Protein	50
3.4.2	Citratsynthase	52
3.4.3	Mitochondriale Ausbeute	54
3.4.4	Citratsynthase-Quotient	54
3.4.5	Respiratorische Kapazität isolierter Mitochondrien	56
3.4.6	Aktivität der Atmungskettenkomplexe in isolierten Mitochondrien	66
3.5	Gen- und Proteinexpression der Atmungskette	69
3.5.1	mRNA Expression	70
3.5.2	ANT Expression	73
3.5.3	Proteinexpression	73
3.5.4	Respirasomen	76
3.6	Mitochondriale Morphologie und Biogenese	78
3.6.1	Mitochondriale Morphologie	78
3.6.2	Marker der mitochondrialen Biogenese	80
4	Diskussion	82
5	Anhang	95
	Literaturverzeichnis	100
	Tabellenverzeichnis	113
	Abbildungsverzeichnis	114
	Eigene Publikationen	116
	Danksagung	118
	Ehrenwörtliche Erklärung	119

Zusammenfassung

Einleitung Eine häufige Ursache für die Entstehung einer Herzinsuffizienz ist die chronische Drucküberlastung des Herzens durch eine Stenose oder Hypertonie. Eine der am häufigsten diskutierten Hypothesen zur Entstehung einer Herzinsuffizienz geht von einem Mangel an ATP aus. ATP entsteht fast ausschließlich in den Mitochondrien der Zelle. Eine mitochondriale Dysfunktion wird demnach mitunter als ursächlich für die Entstehung einer kontraktiven Dysfunktion angesehen. In humanen Proben sowie in Tiermodellen wurde das Vorliegen einer mitochondrialen Dysfunktion in Herz- aber auch im Skelettmuskel bei Herzinsuffizienz gezeigt. Das Zusammenspiel zwischen der mitochondrialen Funktion des Herz- und Skelettmuskels ist bisher jedoch nicht bekannt. Weiterhin ist nicht bekannt, wie die mitochondriale Funktion sich im Verlauf der Entwicklung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz verändert.

Ziel Das Ziel dieser Arbeit war es, das Auftreten einer mitochondrialen Dysfunktion sowohl in Herz- als auch Skelettmuskel der Ratte während der Entwicklung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz zu charakterisieren.

Methodik In 3 Wochen alten SD-Ratten wurde eine Aortenstenose (TAC) induziert. Nach 2, 6, 10 und 20 Wochen wurde die kardiale Funktion sowie die mitochondriale Funktion im Herzmuskel sowie im weißen (Gastrocnemius) und roten (Soleus) Skelettmuskel untersucht.

Ergebnisse Eine kardiale Drucküberlastung führte bereits nach 2 Wochen zu einer Hypertrophie des linken Ventrikels (LV Wanddicke: $2,86 \pm 0,09$ vs. $3,56 \pm 0,05$ mm). Nach 20 Wochen lag eine Dilatation des linken Ventrikels vor (LVEDD: $7,54 \pm 0,20$ vs. $8,44 \pm 0,18$ mm). Die Kontraktilität des linken Ventrikels nahm ab der 6. postoperativen Woche kontinuierlich ab, bis nach 20 Wochen eine Verkürzungsfraction (Fractional Shortening) von unter 30% vorlag (FS: $49,4 \pm 1,4$ vs. $25,8 \pm 1,0$ %). Die diastolische Funktion des linken Ventrikels verschlechterte sich ebenfalls ab der 6. postoperativen Woche (E/E' : $18,9 \pm 1,3$ vs. $27,4 \pm 2,2$). Zeitgleich mit der Verschlechterung der diastolischen Funktion stieg das Lungen-zu-Körpergewicht an. Die respiratorische Kapazität der kardialen Mitochondrien war bereits vor dem Auftreten einer Herzinsuffizienz verändert. Nach 2 Wochen Drucküberlastung war die respiratorische Kapazität erhöht (191 ± 12 vs. 393 ± 29 natomsO/min/mg) und blieb im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Nach 10 Wochen Drucküberlastung erfolgte eine Normalisierung der respiratorischen Kapazität. Zeitgleich mit dem Auftreten einer systolischen Dysfunktion kam es zu einem Abfall der mitochondrialen Funktion (623 ± 109 vs. 186 ± 12). Obwohl der Skelettmuskel nicht

der erhöhten kardialen Drucküberlastung ausgesetzt war, zeigte sich auch hier eine frühzeitige Veränderung der respiratorische Kapazität. Im Soleus kam es nach 2 Wochen ($21,2 \pm 2,0$ vs. $98,6 \pm 13,4$), im Gastrocnemius nach 6 Wochen, zu einem deutlichen Anstieg der respiratorische Kapazität. Diese normalisierte sich ebenfalls nach 10 Wochen und war dann auch nach 20 Wochen stark erniedrigt (Gas: 222 ± 36 vs. 54 ± 5 ; Sol: 111 ± 10 vs. 69 ± 14). Im Gleichklang mit der respiratorische Kapazität veränderte sich auch die Aktivität der einzelnen Atmungskettenkomplexe sowohl im Herz- als auch im Skelettmuskel. Auf einen Anstieg der Aktivität zum Zeitpunkt 2 und 6 Wochen folgte eine Reduktion nach 20 Wochen (Komplex I: Herz 976 ± 54 vs. 705 ± 62 ; Gas 268 ± 19 vs. 109 ± 28 ; Sol 160 ± 16 vs. $67,5 \pm 24,4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Die Gen- und Proteinexpression ausgewählter Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe blieb unverändert. Die Analyse der Respirasomen (Atmungskettenkomplexe in Funktionseinheiten) zum Zeitpunkt der kontraktile Dysfunktion zeigte keine Veränderungen in deren Menge. Die Genexpression verschiedener Marker der mitochondrialen Biogenese (PGC-1 α , PGC-1 β , NRF-1/2 und ERR α) zeigte keine Veränderungen die auf einen Mechanismus hinweisen würden.

Diskussion Eine Aortenzügelung im Alter von 3 Wochen ermöglicht die Einteilung der Entwicklung einer Herzinsuffizienz in drei Phasen: 2 Wochen - kompensierte Hypertrophie, 6-10 Wochen - Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion (HFpEF), 20 Wochen - Herzinsuffizienz mit systolischer Dysfunktion (HFrEF). Jede Phase hat ihre spezielle mitochondriale Funktion: 1.Phase - gesteigerte mitochondriale Funktion, 2. Phase - normalisierte mitochondriale Funktion, 3.Phase - mitochondriale Dysfunktion. Diese Befunde finden sich nicht nur im Herzmuskel sondern parallel dazu auch im Skelettmuskel. Diese Parallelität deutet auf einen arbeitslastunabhängigen Mechanismus als Ursache für das Auftreten einer mitochondrialen Dysfunktion hin.

Schlussfolgerung Das Auftreten einer systolischen Herzinsuffizienz (HFrEF) bei kardialer Drucküberlastung in Ratten ist mit einer mitochondrialen Dysfunktion sowohl in Herz- als auch Skelettmuskel verbunden. Es gibt jedoch bereits Zeichen einer Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion (HFpEF), ohne dass eine mitochondriale Dysfunktion vorliegt. Dies schließt eine mitochondriale Dysfunktion als primäre Ursache für das Auftreten einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz mit großer Wahrscheinlichkeit aus. Weiterhin weist die Parallelität zwischen Herz- und Skelettmuskel auf einen Mechanismus unabhängig der kardialen Drucküberlastung als Ursache einer mitochondrialen Dysfunktion hin.

Kapitel 1

Einleitung

Herzerkrankungen sind eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt (Dickstein et al. 2008). 2009 belegten ischämische Herzerkrankungen, akute Myokardinfarkte und Herzinsuffizienzen die vordersten Plätze in der Statistik der häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland).

Verschiedene epidemiologische Studien eruierten prädisponierende Faktoren für die Entstehung einer Herzinsuffizienz. Dazu zählten unter anderem: steigendes Alter, Diabetes Mellitus, koronare Herzerkrankung, arterielle Hypertonie, Myokardinfarkt, Adipositas, Herzklappenerkrankungen, das metabolische Syndrom oder eine Aortenstenose (Kenchiah et al. 2002, 2004; Levy et al. 1996). Die arterielle Hypertonie, sowie koronare Herzerkrankungen sind die häufigsten Ursachen für die Entstehung einer Herzinsuffizienz (Gillum 1993; Kannel 2000; Lloyd-Jones et al. 2002). Nach Aussage der Framingham-Studie (Lloyd-Jones et al. 2002) werden 39% der Herzinsuffizienzfälle bei Männern sowie 59% bei Frauen durch eine arterielle Hypertonie verursacht.

Eine arterielle Hypertonie aber auch eine Aortenstenose gehen mit einer Drucküberlastung des Herzens einher, in Folge derer das Herz hypertrophiert (Sasayama et al. 1976). Solange diese strukturellen Anpassungen koordiniert vonstatten gehen, besteht ein Stadium der kompensierten Hypertrophie. Gerät die strukturelle Anpassung aus dem Gleichgewicht, dekompensiert das Herz und eine kontraktile Dysfunktion, systolische Herzinsuffizienz, entwickelt sich.

Als Ursache für die Entstehung der kontraktilen Dysfunktion werden verschiedene Mechanismen vermutet. Eine häufig diskutierte Ursache ist das sogenannte »Energy Starvation Konzept«. Dieses Konzept geht von einem Mangel an ATP und einer daraus folgenden kontraktilen Dysfunktion aus (Ingwall u. Weiss 2004; Neubauer 2007). Dieses

Konzept brachte den Fokus der Ursachenforschung auf die ATP-generierende Maschinerie der Zelle, die mitochondriale Atmungskette und deren regulierende Komponenten.

Während der Pathogenese einer Herzinsuffizienz wurden Veränderungen im mitochondrialen Stoffwechsel beschrieben. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass während der Progression einer kardialen Hypertrophie hin zur Herzinsuffizienz die Expression von Genen des mitochondrialen Fettsäurestoffwechsels einheitlich erniedrigt ist (Christe u. Rodgers 1994). Weiterhin wurde eine Verschiebung des myokardialen Stoffwechsels hin zu einem fötalen Muster, welches Glukose an Stelle von Fettsäuren als vorrangiges Substrat nutzt, beobachtet (Christe u. Rodgers 1994). Die Abhängigkeit des Myokards von Glukose als Substrat über längere Zeit kann jedoch zu einem Defizit an ATP führen und somit eine kontraktile Dysfunktion verursachen (Massie et al. 1995; Neubauer et al. 1997). Es wurde weiterhin gezeigt, dass in der Insuffizienz sowohl Glukose- als auch die Fettsäureoxidation stark erniedrigt sind (Doenst et al. 2010) und die ATP-Produktion vermindert ist (Neubauer 2007).

Über 90% des unter aeroben Bedingungen hergestellten ATPs wird durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien gebildet (siehe Abschnitt 1.5). Untersuchungen an myokardialem Gewebe herzinsuffizienter Patienten zeigten, dass die mitochondriale Funktion stark verändert ist. Quigley et al. (Quigley et al. 2000) wiesen eine Korrelation zwischen Auswurffraktion und der Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase nach. Sie folgerten daraus, dass eine verminderte Cytochrom-c-Oxidase Aktivität zu einer verminderten ATP Produktion führen und eine Verschlechterung der Ventrikelfunktion daraus resultieren kann (Quigley et al. 2000). Mit Magnetresonanztomografie konnten ten Hove et al. zeigen, dass im menschlichen Myokard ATP Gehalt, Phosphokreatin sowie Kreatinkinase während einer Herzinsuffizienz erniedrigt sind (Ten Hove u. Neubauer 2007). Garnier et al. zeigten, dass die respiratorische Kapazität sowie die Citratsynthase Aktivität während einer bestehenden Herzinsuffizienz reduziert sind (Garnier et al. 2009). Diese Befunde wurden durch tierexperimentelle Arbeiten weiter gestützt. So konnte im Tiermodell der Aortenzügelung gezeigt werden, dass die Aktivitäten verschiedener mitochondrialer Enzyme (Citratsynthase, Kreatinkinase) und der Enzyme der Atmungskette (Komplex I-V) eingeschränkt sind (Garnier et al. 2009; Marin-Garcia et al. 2001; Momken et al. 2003). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Expression verschiedener Gene, welche die mitochondriale Transkription und Translation koordinieren, reduziert ist (Garnier et al. 2003; Zoll et al. 2006).

Neben einer eingeschränkten Herzfunktion weisen Patienten bei einer Herzinsuffizienz

häufig auch eine eingeschränkte Bewegungstoleranz sowie eine schnellere Ermüdung der Skelettmuskulatur auf. Untersuchungen an Muskelbiopsien von Patienten zeigten deutliche morphologische wie auch biochemische Veränderungen. Zu beobachten war eine Zunahme der glykolytischen Typ IIb Fasern (schnell zuckend - fast twitch) und eine Reduktion der oxidativen, langsamen Typ I und IIa Fasern (langsam zuckend - slow twitch) (Mancini et al. 1989; Sullivan et al. 1990). Drexler et al. (Drexler et al. 1992) konnten Veränderungen in der Volumendichte der Mitochondrien und der Oberflächendichte der mitochondrialen Christae zeigen. Biochemische Untersuchungen ergaben, dass die Aktivität verschiedener mitochondrialer Enzyme (Citratsynthase, Succinatdehydrogenase, Kreatinkinase, β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase) während einer Herzinsuffizienz im Skelettmuskel reduziert ist (Hambrecht et al. 1999; Mancini et al. 1989; Mettauer et al. 2001; Sullivan et al. 1990). Ein weiterer Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion während einer Herzinsuffizienz im Skelettmuskel ist die Beobachtung einer eingeschränkten mitochondrialen respiratorischen Kapazität (De Sousa et al. 2000; Garnier et al. 2003; Rosca et al. 2008; Zoll et al. 2006).

Zum besseren Verständnis der untersuchten Thematik, sollen im Nachfolgenden die Grundlagen der Mitochondrien kurz dargestellt werden.

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien kommen in Eukaryotenzellen vor und sind membranumschlossene Organellen, die Energie aus chemischen Brennstoffen in für die Zelle nutzbare Energie - ATP - umwandeln. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines Mitochondriums.

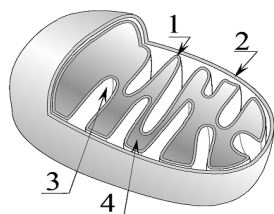


Abbildung 1: Vereinfachter Aufbau eines Mitochondriums. 1 - Innere Membran, 2 - Äußere Membran, 3 - Intermembranraum, 4 - Matrix

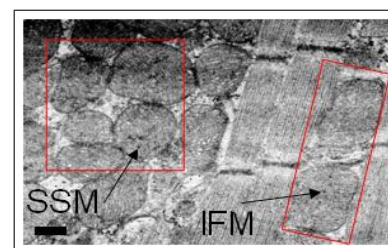


Abbildung 2: Lokalisation der subsarcolemmalen (SSM) und interfibrillären (IFM) Mitochondrien

Im Gewebe gibt es 2 unterschiedlich lokalisierte Mitochondrienpopulationen, die sich anhand ihrer intrazellulären Lokalisation unterscheiden lassen (Abb. 2) (Palmer et al. 1977;

Weinstein et al. 1985). Direkt unterhalb des Sarkolemmes liegen die subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM). Mitochondrien die zwischen den Muskelfasern eingebettet liegen werden als interfibrillare Mitochondrien (IFM) bezeichnet. IFM und SSM unterscheiden sich nicht nur durch ihre Lokalisation, sondern auch durch ihre Morphologie und ihre biochemischen Eigenschaften (Krieger et al. 1980; Riva et al. 2005). Palmer et al. gelang es mittels der differentiellen Zentrifugation erstmals, beide Populationen getrennt zu isolieren (Palmer et al. 1977).

Stoffwechselprozesse im Mitochondrium

Das normotrophe Herz generiert ATP zu 70-90% aus der Oxidation von freien Fettsäuren und zu 10-30% aus der Oxidation von Glukose und Laktat bzw. geringe Mengen aus der Oxidation von Ketonkörpern und verschiedenen Aminosäuren (Taegtmeyer 1994). Die drei wichtigsten Stoffwechselprozesse für die ATP-Bereitstellung im Mitochondrium sind die β -Oxidation der Fettsäuren, der Citratzyklus sowie die oxidative Phosphorylierung.

Die **β -Oxidation** beschreibt den biochemischen Abbau von Fettsäuren. Um sie zu starten, muss die abzubauen Fettsäure im Zytoplasma an Coenzym A gebunden werden. Die aktivierte Fettsäure (Acyl-CoA) kann nicht selbstständig vom Zytoplasma durch die Mitochondrienmembran diffundieren und nutzt daher die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 und 2 sowie die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase. In der Matrix wird die Fettsäure schrittweise, in einer sich wiederholenden Abfolge von 4 Einzelreaktionen, abgebaut. Das Endprodukt des Abbaus einer geradzahligen Fettsäure ist Acetyl-CoA (Nicht-geradzahlige Fettsäure: Propionyl-CoA), welches zur weiteren Oxidation dem Citratzyklus zugeführt wird. Im **Citratzyklus** wird das beim Abbau von Fetten, Zuckern und Aminosäuren als Zwischenprodukt entstehende Acetyl-CoA zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut. Dabei werden sowohl für den Körper nutzbare Zwischenprodukte gebildet wie auch direkt (ATP) und indirekt (Reduktionsäquivalente) Energie in biochemisch verfügbarer Form zur Verfügung gestellt. Die gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 werden in der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette genutzt um ATP zu gewinnen. Während der **oxidativen Phosphorylierung**, werden die an NADH und FADH_2 gebundenen Elektronen (je Acetyl-CoA 8 Reduktionsäquivalente) mit Hilfe einer Reihe von Redoxvorgängen dazu genutzt, aus ADP und Phosphat ATP zu synthetisieren.

1.2 Atmungskette

Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Sie besteht aus 5 Komplexen, welche entweder die innere mitochondriale Membran vollständig durchspannen (Komplex I, III, IV, V) oder in ihr eingebettet sind (Komplex II). Die Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom c sind in der inneren Membran (Ubichinon) bzw. im Intermembranraum (Cytochrom c) lokalisiert.

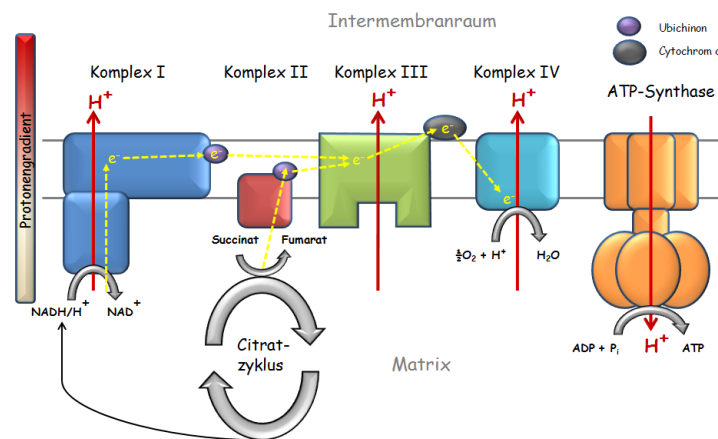


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der mitochondrialen Atmungskette mit den Atmungskettenkomplexen I-IV, sowie der ATP-Synthase (Komplex V) in der inneren Membran der Mitochondrien.

Die **NADH-Dehydrogenase** ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert den Transfer von Elektronen von NADH zu Ubichinon. Während dieses Prozesses pumpt der Komplex vier Protonen je oxidiertem Molekül NADH durch die innere Membran in den Intermembranraum. Die NADH-Dehydrogenase besteht aus mehr als 45 Untereinheiten, von denen 7 durch die mitochondriale DNA kodiert werden. Bei der Oxidation des NADH werden zwei Elektronen auf ein Flavinmononukleotid-Molekül, mehrere Fe-S-Cluster und auf ein freies Ubichinon-Molekül übertragen, welches zu Ubichinol reduziert wird. Ein weiterer Komplex welcher Elektronen auf ein Ubichinon-Molekül übertragen kann ist die **Succinatdehydrogenase**. Sie besteht aus vier Untereinheiten, welche nukleär kodiert werden und ist das einzige Enzym, welches gleichzeitig am Citratzyklus und der Atmungskette teilnimmt. Im Citratzyklus katalysiert es die Oxidation von Succinat zu Fumarat, in der Atmungskette die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol. Das reduzierte Ubichinol überträgt seine Elektronen auf die **Cytochrom-c-Reduktase**. Dieses Enzym fungiert als Oxidoreduktase, indem es in einer

gekoppelten Reaktion die Oxidation von Ubichinol mit der Reduktion von Cytochrom c und der Translokation von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum katalysiert. Es besteht aus 11 Untereinheiten, von denen eine mitochondrial kodiert ist. Die Elektronen wandern vom Ubichinol zu einem gebundenen Cytochrom c. Cytochrom c ist ein mobiler Elektronentransporter, welcher aus einem eisenhaltigen Protein besteht. Das reduzierte Cytochrom c diffundiert innerhalb des Intermembranraumes zur **Cytochrom-c-Oxidase** und gibt das Elektron an das Kupferzentrum dieses Komplexes ab. Die Cytochrom-c-Oxidase katalysiert in einer gekoppelten Reaktion die Oxidation von Cytochrom c mit der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Die Cytochrom-c-Oxidase setzt sich aus 13 Untereinheiten, davon 3 mitochondrial kodiert, zusammen und liegt als Dimer vor. Während des katalytischen Zyklus der Cytochrom-c-Oxidase wird ein Molekül Sauerstoff (O_2) zu zwei Molekülen Wasser (H_2O) reduziert. Als Reduktionsmittel werden vier Elektronen von vier Molekülen Cytochrom c sowie Protonen für die Wasserbildung aus dem Innenraum des Mitochondriums gebraucht.

Die Komplexe I, III und IV fungieren als Protonenpumpen und bauen einen elektrochemischen Gradienten zwischen der Matrix und dem Intermembranraum auf. Diesen Gradienten macht sich die **ATP-Synthase** zu Nutze. Sie koppelt einen transmembranen Protonentransport mit der Synthese von ATP aus ADP und organischem Phosphat. Die mitochondriale ATP-Synthase setzt sich vermutlich aus 17 Untereinheiten zusammen, wobei 2 Untereinheiten mitochondrial kodiert sind. Sie gruppieren sich zu zwei Komplexen. Der wasserlösliche Komplex F_1 katalysiert die Bildung von ATP und der wasserunlösliche, in die Membran eingebaute Komplex F_0 , transportiert Protonen. Der Protonenfluss wird für den Antrieb der ATP-Synthase genutzt und treibt wie ein Wasserstrom den Rotor an. Um ATP aus ADP und Phosphat entstehen zu lassen, finden Strukturänderungen im katalytischen Zentrum statt, welche die beiden Substrate (ADP + Phosphat) zur Reaktion bringen. Das durch die ATP-Synthase gebildete ATP wird im Austausch für ADP durch den Adeninnukleotidtransporter ins Zytosol transportiert, wo es vorwiegend für die Energieversorgung des Kontraktionszyklus genutzt wird und praktisch alle energieversorgenden Prozesse der Zelle unterstützt.

Die einzelnen Komponenten der mitochondrialen Atmungskette sowie deren Funktionsweise sind bisher gut bekannt. Jedoch konnte die Organisation d.h. die physische Anordnung der Atmungskette noch nicht zufriedenstellend geklärt werden. Es werden zwei alternative Modelle diskutiert. Das gebräuchlichste Modell ist das »random-collision« Modell

(Hackenbrock et al. 1986). Es besagt, dass alle Komponenten der Atmungskette sich frei in der inneren Mitochondrienmembran bewegen können und der Elektronentransfer abhängig ist, von der zufälligen Begegnung der 4 Komplexe sowie der zwei Elektronentransporter. In dem Modell des »solid-state« wird davon ausgegangen, dass die respiratorischen Komplexe zu großen, hochmolekularen Strukturen, sogenannten Respirasomen, zusammengefügt sind (Chance u. Williams 1955). Diese sollen einen schnelleren und effizienteren Elektronentransport ermöglichen. Anhand der blau nativen Gelelektrophorese (BN-PAGE) konnte die Existenz dieser Respirasomen nachgewiesen werden (Schagger u. Pfeiffer 2000).

Die Aktivität der Atmungskette wird nicht nur durch die Funktion der Atmungskettenkomplexe bestimmt sondern ist auch abhängig von der Menge der Atmungskettenproteine. Diese Proteinexpression wird vorrangig durch die mitochondriale Biogenese gesteuert.

1.3 Regulation der mitochondrialen Biogenese

Die mitochondriale Biogenese umfasst das Wachstum und die Teilung von bereits existierenden Mitochondrien. Ein komplexes Regulationssystem ist nötig, um die mitochondrialen und nukleären Proteinexpressionen koordiniert ablaufen zu lassen. Der Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese, der sowohl die mitochondriale als auch die nukleäre Genexpression steuert, ist PGC-1 α (Kelly u. Scarpulla 2004). PGC-1 α interagiert mit Proteinen aus der Familie der nukleären Hormonrezeptoren (PPAR α , PPAR γ , TR β). Weiterhin reguliert es die Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren der mitochondrialen Biogenese (Knutti u. Kralli 2001). PGC-1 α kann mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren interagieren und sie durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion co-aktivieren (Wu et al. 1999). Dazu zählen NRF1 und NRF2 sowie Tfam. Induziert wird die Expression von PGC-1 α durch Diabetes, Training oder Fasten, gehemmt dagegen durch pathologische Hypertrophie sowie Herzinsuffizienz (Finck u. Kelly 2007).

Durch die Interaktion von PGC-1 α mit PPAR γ wird die Expression mitochondrialer Enzyme und Transportproteine, welche wichtig für die Fettsäureoxidation sind, reguliert und die Fettsäureoxidation erhöht. Des Weiteren interagieren PGC-1 α und PGC-1 β mit ERR α . ERR α gehört zur Familie der Orphan-Rezeptoren und kann die Expression von Genen für verschiedene Stoffwechselprozesse (Fettsäuretransport, β -Oxidation,

Citratzyklus, OXPHOS, mitochondriale Biogenese, ROS-Abwehr) induzieren. Abhängig vom Zelltyp kann $ERR\alpha$ auch die Fettaufnahme, die respiratorische Kapazität und die ROS-Produktion beeinflussen sowie die Glukoseoxidation hemmen. $ERR\alpha$ kann die mitochondriale Biogenese auch indirekt beeinflussen, indem es andere Transkriptionsfaktoren ($NRF1/2$ und $PPAR\alpha$) aktiviert (Huss et al. 2004; Mootha et al. 2004). $NRF1/2$ sind Transkriptionsfaktoren, die durch $PGC-1\alpha$ vermehrt exprimiert und co-aktiviert werden und dann an Promotorbindungsstellen anderer Gene binden und deren Expression erhöhen. Für $NRF1/2$ wurden bereits Promotorbindungsstellen auf zahlreichen nukleär kodierten Genen gefunden, die für mitochondriale Proteine kodieren. Ein Großteil dieser Proteine ist Teil der mitochondrialen Atmungskette (Kelly u. Scarpulla 2004). So wird die Expression fast aller nukleär kodierten Komplexuntereinheiten durch die Transkriptionsfaktoren $NRF1/2$ gesteuert (Scarpulla 2006).

Problemstellung und Ziel dieser Arbeit

In humanen Proben sowie in Tiermodellen wurde das Vorliegen einer mitochondrialen Dysfunktion in Herz- aber auch im Skelettmuskel bei Herzinsuffizienz gezeigt. Das Zusammenspiel zwischen der mitochondrialen Funktion des Herz- und Skelettmuskels ist bisher jedoch nicht bekannt. Weiterhin ist nicht bekannt, wie die mitochondriale Funktion sich im Verlauf der Entwicklung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz verändert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Auftreten einer mitochondrialen Dysfunktion sowohl in Herz- als auch Skelettmuskel der Ratte während der Entwicklung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz zu charakterisieren.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Für die Experimente wurden männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Ein Teil der Ratten wurde von Janvier (Le Genest, Frankreich) bezogen, die restlichen Tiere stammten aus der Zucht des medizinisch-experimentellen-Zentrums der Universität Leipzig (MEZ). Die Unterbringung der Tiere erfolgte im MEZ bei 21°C und einem 12h Lichtzyklus. Sie wurden in standardisierten Käfigen gehalten und erhielten freien Zugang zu Wasser und Futter. Alle Versuche mit Tieren wurden durch die Tierschutzkommission Leipzig genehmigt (TVV 36/06).

2.1.2 Geräte

- Ultra-Turrax T25 (600W, 8750 U/min) mit einem S25N-18G Dispergierwerkzeug, Janke & Kunkel - IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
- Ultra-Turrax T8 (100W, 20000 U/min) mit einem S8N-5G Dispergierwerkzeug, Janke & Kunkel - IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
- Glas-Homogenisator nach Potter-Elvehjem mit einem locker passenden Teflon-Pistill, angetrieben von einem RE 16 Rührgerät (25W, 2000 bzw. 750 U/min), Janke & Kunkel - IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
- Sorvall Zentrifuge RC5B Plus, Rotor SS 34, Sorvall Products (Newtown, CT, USA)

- Heraeus Fresco 17 Zentrifuge, Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, USA)
- Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, Biotek (Winooski, VT, USA)
- UV-Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro, Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
- Sauerstoffelektrode mit Mitocell MT200A , Strathkelvin (Glasgow, Schottland)
- Dual-Channel Oxygen Meter (Model 782), Warner Instruments LLC (Hamden, CT, USA)
- ABI Prism 9700 HT Sequence Detection System, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
- Elektrophoresekammer Mini Protean 3 Cell, BioRad (München, Deutschland)
- Elektrophoresekammer Blue Vertical 101, Serva (Heidelberg, Deutschland)
- BioRad - Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell
- Rodent Ventilator Type 7025, Ugo Basile (Comerio, VA, Italien)
- Durchflusszytometer LSR II, Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
- Ultraschallgerät Vevo 770, Visual Sonics (Toronto, Kanada) verwendet mit einem Schallkopf 716 (11-24MHz)

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), BioRad (München, Germany), Carl Roth (Karlsruhe, Germany) und VWR (Darmstadt, Germany) bezogen.

2.1.4 Medikamente

Tabelle 1: Verwendete Arzneimittel

Medikament	Wirkstoff	Hersteller
Thiopental	Thiopental-Natrium	Inresa
Ketamin	Ketaminhydrochlorid	Inresa
Rompun	Xylazinhydrochlorid	Bayer
Novaminsulfon	Metamizol-Natrium-Monohydrat	Ratiopharm
Fentanyl	Fentanyl	Janssen-CILAG

2.2 Methoden

2.2.1 Chirurgische Eingriffe

Durch Zügelung des Aortenbogens wurde eine künstliche Drucküberlastung des Herzens hervorgerufen, welche im zeitlichen Verlauf zu einer Herzinsuffizienz führte. Dieser operative Eingriff erfolgte an männlichen Sprague-Dawley Ratten, welche zum Zeitpunkt der Operation ungefähr 50g wogen, dies entsprach einem ungefähren Alter der Tiere von 3 Wochen. Die Tiere wurden mit einer Narkose bestehend aus Ketamin 10%, Xylazin 2% und aqua dest., im Verhältnis 1:1:2 narkotisiert (3ml/kg Körpergewicht i.p.).

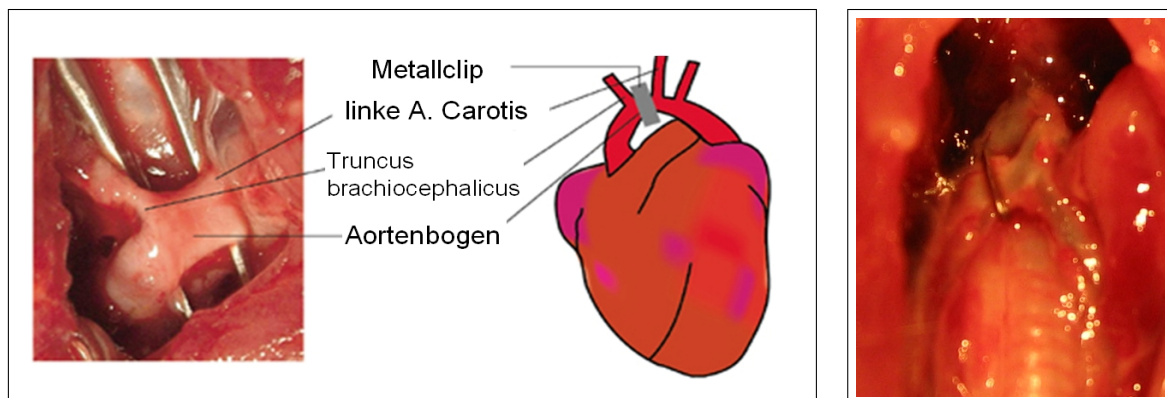


Abbildung 4: Foto des frei präparierten Aortenbogens und schematische Darstellung der Aortenzügelung

Abbildung 5: Präparierter Aortenbogen mit plziertem Clip

Zu Beginn der Operation wurden die Tiere intubiert. Hierzu wurde ein Längsschnitt durch die Haut über dem Sternum bis zur Trachea gesetzt. Mit Hilfe einer stumpfen Pinzette

wurde die Trachea frei präpariert. Die Intubation der Tiere erfolgte unter visueller Kontrolle mit einer 16G Kanüle, welche als Tubus fungierte. Daraufhin wurde die Kanüle an ein Beatmungsgerät angeschlossen und die Tiere mit Raumluft beatmet. Anschließend wurde eine partielle Sternotomie durchgeführt und der Thymus entfernt. Der Aortenbogen wurde mit einer stumpfen Pipette präpariert und ein Titanclip, mit Hilfe einer Zange, zwischen dem Abgang des Truncus brachiocephalicus und der linken Arteria carotis communis platziert. Abb. 4 zeigt auf der linken Seite ein Foto der anatomischen Verhältnisse nach Freilegung des Aortenbogens und auf der rechten Seite eine schematische Darstellung der Aortenzügelung. Abb. 5 zeigt eine fotografische Aufnahme einer Aortenzügelung.

Die Sternotomie sowie die Operationswunde wurden mittels einer Naht verschlossen. Nachdem eine suffiziente Spontanatmung festgestellt wurde, wurden die Tiere extubiert. Es erfolgte eine Schmerzmedikation mit dem Schmerzmittel Novaminsulfon über das Trinkwasser für 3-4 Tage.

2.2.2 Echokardiografie

Nach 2, 6 und 10 Wochen kardialer Drucküberlastung wurden die Tiere echokardiografisch untersucht. Um das Auftreten der systolischen Dysfunktion verfolgen zu können, wurde ab der 12. postoperativen Woche wöchentlich eine echokardiografische Untersuchung durchgeführt. Nach Einleitung der Narkose mittels Isofluran (1,5%), erfolgte die Rasur der Brust und die Positionierung des Tieres in Rückenlage auf einem beheizten Untersuchungstisch. In der parasternalen Ausrichtung des Schallkopfes wurde ein Zweikammerblick der linken Herzseite auf Höhe des Papillarmuskels aufgesucht. Hierbei konnten Aufnahmen im M-Mode (Bild entlang einer Schnittlinie im Zeitverlauf) des linken Ventrikels erstellt werden. Im M-Mode konnten neben der Herzfrequenz auch die Wandstärken des linken Ventrikels, Vorderwand und Hinterwand, in Systole und Diastole ermittelt werden. Ferner erlaubte diese Aufnahme die Bestimmung von end-systolischem (LVESD) und end-diastolischem (LVEDD) Durchmesser des linken Ventrikels. Aus den Ergebnissen dieser Messung wurden weitere Parameter ermittelt.

$$\text{Ejektionsfraktion in \%} = \frac{EDV - ESV}{EDV}$$

$$\text{Verkürzungsfraktion (Fractional Shortening) in \%} = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD}$$

EDV = Enddiastolische Volumen

ESV = Endsystolisches Volumen

Durch Neigung des Schallkopfes konnte die Ebene des Vierkammerblickes erreicht werden. In dieser Ebene konnte mittels Pulsed-Wave und Tissue Doppler die Flussgeschwindigkeit über der Mitralklappe sowie die Myokardbewegung am septalen Mitralanulus bestimmt werden.

2.2.3 Organentnahme und Herstellung der Muskelhomogenate

Organentnahme

Am Ende des jeweiligen Versuchszeitraumes (2 Wochen, 6 Wochen, 10 Wochen und Herzinsuffizienz) wurden die Tiere gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion mit Thiopental (150mg/kg) narkotisiert. Während des Öffnens des Bauchraumes sowie des Brustkorbes wurde auf mögliche Flüssigkeitsansammlungen sowie krankhafte Veränderungen der Organe geachtet. Nachdem das Herz explantiert und in Chappel-Perry Puffer CP1 (100mM KCl, 50mM MOPS, 1mM EGTA, 5mM MgSO₄·7H₂O, 1mM ATP; pH 7,4) auf Eis gelagert wurde, wurden anschließend die beiden Unterschenkelmuskeln *Musculus gastrocnemius* und *Musculus soleus* aus jedem Bein entnommen. Der Gastrocnemius wurde ebenfalls in CP1, der Soleus in kardiopleger Lösung (180mM KCl, 10mM EDTA; pH 7,4) auf Eis aufbewahrt. Nach der Muskelentnahme wurden zusätzlich Leber und Lunge entnommen und gewogen.

Die entnommenen Muskeln (Herz, Gastrocnemius, Soleus) wurden anschließend homogenisiert und aus dem Homogenat die Mitochondrien isoliert.

Homogenatherstellung Herz

Nach der Entnahme wurde das Herz mehrfach mit CP1 Puffer gespült. Extrazelluläres Gewebe und Arterien wurden entfernt und das gesamte Herzgewicht ermittelt. Anschließend wurde durch Sektion beider Atrien das Ventrikelgewicht bestimmt. Der Ventrikel wurde dann mittels einer Schere im Becherglas zerkleinert und mehrfach mit CP1 gespült. Das zerkleinerte Herz wurde in ein Homogenisierungsröhrchen überführt und mit 10ml CP2 (CP1 + 2mgBSA/ml) / g Herz verdünnt. Die Suspension wurde für 2,5 Sekunden mittels eines Ultra-Turrax mit 9000 rpm homogenisiert. Zum Abschluss der Homogenisierung erfolgten 2 Durchzüge mit einem locker sitzenden, motorgetriebenen Teflon-Pistill (600-800 rpm) und anschließend die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mittels Tris/HCl-Lösung (100mM). Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das fertige Homogenat wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Homogenatherstellung Gastrocnemius

Beide Gastrocnemii wurden von Sehnen und anhaftenden Haaren befreit und gewogen. Sie wurden mittels einer Schere in einem Becherglas zerkleinert und mehrfach mit CP1 gespült. Das zerkleinerte Muskelgewebe wurde in ein Homogenisierungsröhrchen überführt und mit 10ml CP2 (CP1 + 2mgBSA/ml)/g Muskel verdünnt. Die Suspension wurde für 2,5 Sekunden mittels eines Ultra-Turrax mit 9000 rpm homogenisiert. Zum Abschluss der Homogenisierung erfolgten 2 Durchzüge mit einem locker sitzenden, motorgetriebenen Teflon-Pistill (600-800 rpm) und anschließend die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mittels Tris/HCl-Lösung (100mM). Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das fertige Homogenat wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Homogenatherstellung Soleus

Nachdem Sehnen und anhaftende Haare an beiden Soleii entfernt wurden, wurden sie gewogen und anschließend auf einem Wägeschälchen auf Eis mittels einer Schere zerkleinert. Die zerkleinerten Muskeln wurden in ein Homogenisierungsröhrchen überführt und mit dem 4 fachen Volumen an KEA (180mM KCl, 10mM EDTA, 0,5% BSA; pH 7,4) verdünnt. Die Suspension wurde mit einem Ultra Turrax T25 bei 2500rpm für 20 Sekunden homogenisiert. Der Turrax wurde nach der Homogenisierung mit einer Volumeneinheit KEA gespült und das daran haftende Gewebe im Homogenisierungsröhrchen aufgefangen. Es folgte ein Durchzug mit einem motorgetriebenen Teflon-Pistill bei 2000 rpm. Das Homogenat wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, das noch am Homogenisierungsröhrchen haftende Gewebe wurde mit einer Volumeneinheit KEA gelöst und ebenfalls ins Reaktionsgefäß überführt. Somit entsprach die finale Verdünnung des Homogenates dem 6-fachen des Soleusvolumens. Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das fertige Homogenat wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.4 Isolation der Mitochondrien

Die Isolation der Mitochondrien aus den oben genannten Homogenaten erfolgte nach dem Prinzip der differentiellen Zentrifugation nach Palmer et al. (Palmer et al. 1977). Aus Herz- sowie Gastrocnemius-homogenat wurden zwei mitochondriale Subpopulationen isoliert, die interfibrillären (IFM) und die subsarkolemmalen (SSM) Mitochondrien. Aus dem Homogenat des Soleusmuskels wurden ebenfalls zwei mitochondriale Subpopulationen

isoliert, die jedoch auf Grund des geringen Volumens am Ende des Isolationsverfahrens wieder zusammengeführt wurden.

Mitochondrienisolation aus Herz- und Gastrocnemius-homogenat

Abbildung 6 zeigt das Isolationsverfahren zur Gewinnung der zwei mitochondrialen Subpopulationen. Nachdem das Homogenat bei 580xg zentrifugiert wurde, befanden sich die subsarkolemmalen Mitochondrien im Überstand und die interfibrillären Mitochondrien in den Muskelfibrillen im Pellet. Der Überstand mit den SSM wurde vorsichtig abgegossen und auf Eis aufbewahrt, das Pellet und die darin enthaltenen IFM wurden mit CP1 Puffer resuspendiert. Um die IFM aus den Muskelfasern zu lösen, erfolgte eine Proteolyse der Muskelfasern mit dem Enzym Trypsin. Nach 10 Minuten erfolgte durch die Zugabe von CP2 der Stopp der Proteolyse. Es folgte eine Zentrifugation bei 5.900xg mit anschließender Resuspension des Pellets in CP1 Puffer. Anschließend wurde die Suspension nochmals zentrifugiert (580xg) so dass die aus den Muskelfasern herausgelösten IFM sich im Überstand befanden. Im Anschluss an die Isolation der Mitochondrien erfolgten drei Aufreinigungsschritte. Hierzu wurden die Mitochondrien jeweils in KME Puffer (100mM KCl, 50mM MOPS, 0,5mM EGTA; pH 7,4) resuspendiert und bei 5.900xg zentrifugiert.

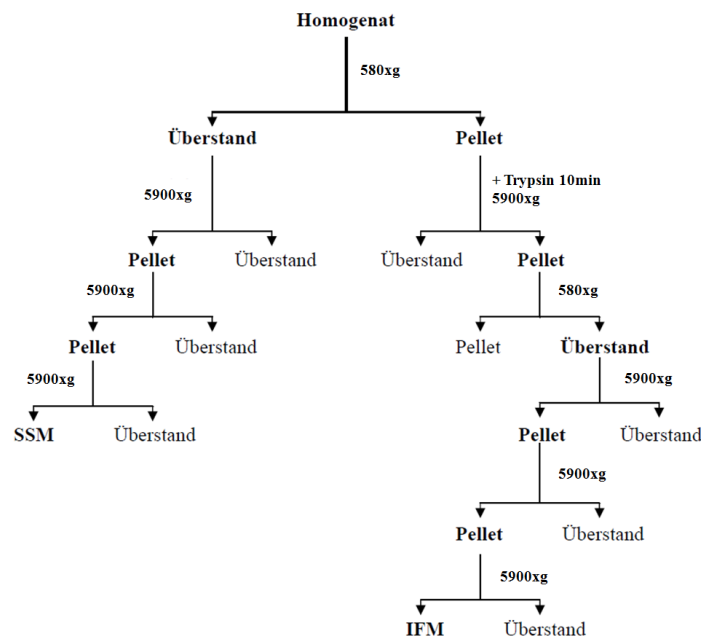


Abbildung 6: Schema zur Isolierung von subsarkolemmalen und interfibrillären Mitochondrien

Mitochondrienisolation aus Soleushomogenat

Die Isolation der Mitochondrien des Soleusmuskels erfolgte mit Hilfe einer Tischzentrifuge. Das Homogenat wurde bei 100xg zentrifugiert, so dass sich die SSM im Überstand und die IFM im Pellet befanden. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Das Pellet, welches die Muskelfibrillen und die dazwischen liegenden IFM enthielt, wurde in KEA Lösung resuspendiert und eine Proteolyse der Myofibrillen mit dem Enzym Nargase (Protease XXIV) folgte. Nach einer Inkubationszeit von 30sec wurde eine Zentrifugation bei 5900xg für 5 min gestartet. Das erhaltene Pellet wurde mit KEA resuspendiert und bei 100xg zentrifugiert. Der IFM-haltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit den auf Eis wartenden SSM zusammen geführt. Anschließend erfolgten zwei Aufreinigungsschritte bei denen die Suspension mit 5900xg zentrifugiert und das Pellet mit KME Lösung resuspendiert wurde. Sämtliche Isolationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

2.2.5 Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität

Die Citratsynthase ist ein Enzym der mitochondrialen Matrix. Sie kann auf Grund dieser Lokalisation als mitochondriales Markerenzym verwandt werden. Chemnitius et al. (Chemnitius et al. 1988) unterschieden in vitro eine latente von einer freien Enzym-Aktivität. Die Summe dieser beiden Aktivitäten ergibt die Gesamtaktivität der Citratsynthase. Wird die Citratsynthase (CS) in einer Mitochondrien-Präparation ohne vorherige Desintegration der strukturell intakten Mitochondrienmembran gemessen, so wird der Anteil der CS-Aktivität bestimmt, der frei für die Substrate zugänglich ist (CS-frei). Dies ist zum Beispiel bei präparationsbedingter Schädigung der Mitochondrienmembran möglich. Das Enzym liegt dann im Isolationsmedium frei vor oder ist in den zerstörten Mitochondrien für die Substrate zugänglich. Für die Bestimmung der gesamten CS-Aktivität (CS-gesamt) muss die Doppelmembran der intakten Mitochondrien zerstört werden, da die Substrate des Enzyms die innere Mitochondrienmembran nicht passieren können. Aus der Differenz der gesamten und der freien CS-Aktivität errechnet sich der latente Aktivitätsanteil (CS-latent), d.h. die CS-Aktivität, die erst nach Desintegration der Mitochondrienmembran freigesetzt wird. Sie ist ein Maß für die strukturelle Intaktheit einer Mitochondrienpräparation. Der Citratsynthase-Quotient (CSR), als Quotient aus latenter und freier CS-Aktivität, gilt als Marker für die strukturelle Integrität einer Mitochondrienpopulation (Chemnitius et al. 1988).

Die Citratsynthase-Aktivität wurde nach der Methode von Srere (Srere 1969) bestimmt. Die bei der Synthese von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat freiwerdenden SH-Gruppen des CoA-SH reagieren stöchiometrisch mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) unter Freisetzung von Mercaptid-Anionen. Diese Mercaptid-Anionen lassen sich photometrisch bei $\lambda=412\text{nm}$ nachweisen und quantifizieren. Es lassen sich zwei Aktivitätsanteile an den Steigungen der Extinktionsaufzeichnungen bestimmen. Der erste Anteil entspricht einer unspezifischen Hydrolyse des Acetyl-CoA durch sonstige Enzyme mit Hydrolyse-Aktivität. Der zweite Anteil entspricht der unspezifischen Aktivität plus der Citratsynthase-Aktivität, die nach Zugabe von Oxalacetat (10mM/l) gestartet wird. Nach Subtraktion der beiden Aktivitätsanteile voneinander erhält man die Citratsynthase-Aktivität.

Tabelle 2: Pipettierschema für die Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität

	Freie Aktivität	Gesamte Aktivität
Inkubation:		
50µl Probe mit 50µl 0,9% NaCl	50µl	-
50µl Probe mit 50µl 5% Triton X-100	-	50µl
H ₂ O	775µl	775µl
1 mM DTNB in 1M Tris/HCl pH 8,5	100µl	100µl
5 mM Acetyl-CoA	25µl	25µl
Aufzeichnung der Extinktion ($\lambda= 412\text{nm}$; 25°C ; 2:20min)		
Oxalacetat (10 mM in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5)	50µl	50µl
Aufzeichnung der Extinktion ($\lambda= 412\text{nm}$; 25°C ; 2:20min)		

Für die Bestimmung der gesamten CS-Aktivität wurden 50µl Mitochondrien mit 50µl des nicht-ionischen Tensids Triton X-100 (5%ige Lösung) für 5 Minuten vorinkubiert. Dadurch kommt es zur Zerstörung der mitochondrialen Struktur. Nach Zugabe von Oxalacetat konnte somit die Gesamtaktivität der Citratsynthase gemessen werden. Die freie Aktivität der Citratsynthase wurde nach Vorinkubation in isotonischer NaCl-Lösung (0,9%) gemessen. Tab. 2 zeigt das verwendete Pipettierschema.

2.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung der Muskelhomogenate und Mitochondrienisolate wurde nach der Bradford-Methode (Bradford 1976) durchgeführt. Die Bradford-Reagenz der Firma BioRAD enthielt Coomassie blue, Ethanol (96%), H_3PO_4 und H_2O . Die ungebundene (kationische), rote Form des Farbstoffs hat bei 470nm ihr Maximum im Absorptionsspektrum. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595nm. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes außerdem sehr viel höher als der des freien Farbstoffes ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595nm durch die Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die jeweiligen Proben wurden verdünnt und mit der Bradford-Reagenz versetzt, nach einer Inkubationszeit von 3 min wurde die Extinktion der Probe bei 595nm bestimmt. Ebenso wurde die Extinktion gegen einen Leerwert photometrisch bestimmt. Mit Hilfe einer Standardkurve (Rinderserum-Albumin) wurde der tatsächliche Proteingehalt der Probe berechnet.

2.2.7 Bestimmung der respiratorischen Kapazität

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs der isolierten Mitochondrien erfolgte mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode in einer Reaktionskammer mit einem Gesamtvolumen von 1ml. Die Temperatur in der Reaktionskammer wurde durch einen Wassermantel kontinuierlich auf 25°C gehalten. Abb. 7 zeigt die verwendete Reaktionskammer. Sie

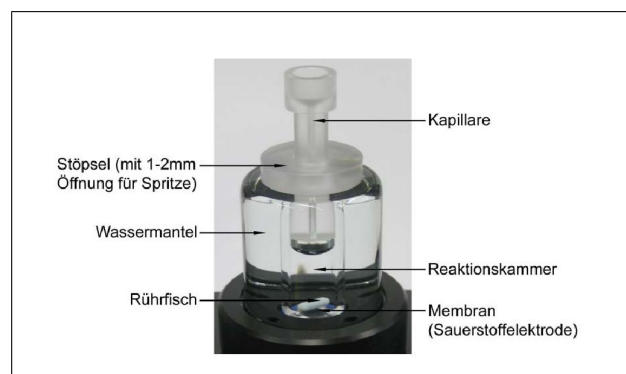


Abbildung 7: Aufbau der verwendeten Atmungskammer

hat an ihrem oberen Ende eine Öffnung, die durch einen hierfür eigens vorgesehen

Verschlussstift verschlossen werden kann. Der Verschlussstift seinerseits enthält eine Kapillare mit einem Durchmesser von ca. 1-2mm. Durch diese Kapillare können im weiteren Versuchsablauf Reagenzien mittels einer Spritze in die Reaktionskammer appliziert werden. Atmosphärischer Sauerstoff hat auf Grund dieser Versuchsanordnung keinen Einfluss auf die Messung des Sauerstoffverbrauchs in der Reaktionskammer.

Sauerstoffelektrode:

Die Messung des Sauerstoffgehaltes in der Reaktionskammer wurde mit einer Elektrode nach Clark durchgeführt (Clark et al. 1953). Das Prinzip der Elektrode besteht in der Messung des elektrischen Stroms, der bei der Reduktion des Sauerstoffs an der Kathode entsteht. Dieser Strom ist bei einer angelegten Spannung von 0,4-0,8V ausschließlich von der Zahl der O₂-Moleküle abhängig, die pro Zeiteinheit die Elektrode erreichen und reduziert werden. Somit kann eine Veränderung des Sauerstoffgehaltes in der Reaktionskammer über den veränderten Strom aufgezeichnet werden. Konstante Diffusionsbedingungen werden erreicht, indem die Elektrode mit einer für Sauerstoff permeablen Membran überzogen und die Lösung ständig gerührt wird.

Kalibrierung der Sauerstoffelektrode:

Die Kalibrierung wurde täglich nach einer Methode von Lehninger (Lehninger 1951) unter Verwendung unkontrolliert atmender Mitochondrien und NADH durchgeführt. Um die Enzyme der Atmungskette für das Substrat NADH frei zugänglich zu machen, wurden die Mitochondrien zur Desintegration ihrer Doppelmembranen tiefgefroren und wieder aufgetaut. Die Übertragung der Elektronen auf den Sauerstoff findet in diesen Präparationen unabhängig von ADP stöchiometrisch statt. Für jedes Sauerstoff-Molekül werden 2 NADH-Moleküle zur Übertragung des Wasserstoffs benötigt. Die Reaktionskammer wurde mit 950µl Respirationsmedium (210mM Mannitol, 70mM Saccarose, 5mM KH₂PO₄, 10mM Tris-Base; pH 7,4) und 50µl der Mitochondrienpräparation befüllt und bei 25°C mit Luftsauerstoff äquilibriert. Durch mehrfache Zugabe von NADH (25µl, 1mM) wurde eine Kalibrierungskurve aufgezeichnet. Anhand der aufgezeichneten Kurve sowie der täglich gemessenen Extinktion des NADH ließ sich der Kalibrierungsfaktor (nAtomeO/mm) berechnen.

Verwendete Substrate:

Um die funktionellen Komponenten der oxidativen Atmungskette untersuchen zu können,

wurden Substrate genutzt, die verschiedene mitochondriale Transportsysteme und Dehydrogenasen verwenden und ihre Elektronen an verschiedene Komponenten der Atmungskette abgeben. Es wurden die Komplex I Substrate Glutamat, Pyruvat und Palmitoylcarnitin und das Komplex II Substrat Succinat verwendet. Die Besonderheiten eines jeden Substrates werden im Folgenden beschrieben.

Glutamat Glutamat ist eine essentielle Aminosäure und spielt eine wesentliche Rolle im Zellstoffwechsel. Die Oxidation des Glutamat reflektiert die mitochondriale Glutamataufnahme, die Glutamatdehydrogenaseaktivität und die allgemeine Aktivität der Elektronentransportkette. Bei der Umwandlung von Glutamat zu α -Ketoglutarat und weiterführend von α -Ketoglutarat zu Succinat wird NADH freigesetzt. Dieses Reduktionsäquivalent gibt seine Elektronen an Komplex I ab. Des Weiteren wird bei der folgenden Umwandlung von Succinat zu Fumarat FADH_2 freigesetzt, welches wiederum seine Elektronen an Komplex II abgeben kann. Somit ist Glutamat hauptsächlich ein Komplex I, aber auch ein Komplex II Substrat.

Pyruvat Pyruvat ist das Anion der Brenztraubensäure. Mit Hilfe des Pyruvates kann man die Funktion der Monokarbontransporter und der Pyruvatdehydrogenase (PDH) abschätzen. Die PDH ist ein großer Enzymkomplex, welcher die irreversible oxidative Decarboxylierung von Pyruvat katalysiert. Bei der oxidativen Decarboxylierung wird vom Pyruvat (C_3) Kohlenstoffdioxid (CO_2) abgespalten und ein NADH gewonnen. Dabei wird eine energiereiche Thioesterbindung zwischen Coenzym A und dem Acetatrest gebildet und Acetyl-CoA entsteht. Acetyl-CoA tritt dann in den Citratzyklus ein und die Citratsynthase katalysiert die Kondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat. Durch die Zugabe von Malat, einer Dicarbonsäure, wird die Bildung von FADH_2 verhindert und genügend Oxalacetat für die Kondensation von Acetyl-CoA zu Citrat bereitgestellt. Somit liefert die Oxidation des Substratgemisches Pyruvat/Malat nur NADH für Komplex I und keine Reduktionsäquivalente für Komplex II.

Palmitoylcarnitin Mit Hilfe der Fettsäure Palmitoylcarnitin kann die Funktionalität der Carnitinpalmitoyltransferase 2 (CPT-2) und der β -Oxidation beschrieben werden. In der Carnitin-Form kann die Fettsäure mit Hilfe des Carnitin-Acylcarnitin-Transporters vom Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix gelangen. Hier wird mit Hilfe der CPT-2 das Carnitin abgespalten und es liegt die aktivierte Form der Fettsäure vor, das Acyl-CoA.

In der Mitochondrienmatrix findet nun die eigentliche β -Oxidation statt, der Abbau von Acyl-CoA zu Acetyl-CoA. Das gebildete Acetyl-CoA kann zum weiteren Abbau in den Citrat-Zyklus einfließen oder zur Synthese von Ketonkörpern dienen. FADH_2 und NADH , die während der β -Oxidation gebildet werden, werden der Atmungskette zugeführt. Der Abbau von Fettsäuren ist eine Reaktionsfolge, bei der sehr viel für den Körper nutzbare Energie frei wird. Bei einem vollständigem Abbau von einem Molekül Palmitat (durch β -Oxidation, Citrat-Zyklus und Atmungskette) werden etwa 98 bis 106 Moleküle ATP gebildet. Im Vergleich dazu entstehen bei dem Abbau von einem Molekül Glukose im statistischen Mittel nur etwa 30 Moleküle ATP. Durch die Zugabe von Malat wird die FADH_2 Bildung während des Citratzyklus unterbunden und genügend Oxalacetat für die Kondensation von Acetyl-CoA zu Citrat bereitgestellt.

Succinat Succinat ist eine Dicarbonsäure und spielt eine wichtige Rolle im Citratzyklus. Succinat wird mit FAD zu Fumarat und FADH_2 oxidiert. Dies geschieht mit Hilfe der Succinatdehydrogenase, welche Teil des Atmungskettenkomplexes II ist. Somit liefert Succinat nur Reduktionsäquivalente, welche über Komplex II in die Atmungskette eingeleitet werden. Um einen Elektronenrückfluss auf Komplex I zu verhindern, wird dieser mit Rotenon gehemmt.

Versuchsdurchführung:

Für die Atmungsmessung wurde die Versuchskammer mit Respirationsmedium und isolierten Mitochondrien gefüllt, so dass eine Mitochondriendichte von 1U CS/ml in der Atmungskammer vorlag. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrates und die Aufzeichnung der substratmotivierten Atmung (State 2 Atmung). Durch Zugabe von ADP wurde die maximale respiratorische Kapazität, State 3 Atmung, angeregt. Nach der vollständigen Phosphorylierung des zugegebenen ADP zu ATP wurde die ADP-limitierte Atmung, State 4 Atmung, gemessen. In Abbildung 8 ist der Verlauf der Atmungskurve schematisch dargestellt.

Die Atmungskapazität der Mitochondrien wurde mit verschiedenen Substraten bestimmt. Die genauen Zugabemengen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Bei der Atmungsmessung mit dem Komplex II Substrat Succinat, wurde vor der eigentlichen Substratzugabe Rotenon appliziert, um den Rückfluss der Elektronen zu Komplex I zu hemmen.

Die Phosphorylierung des ADP zu ATP an Komplex V ist abhängig vom Membranpotential, welches durch die Komplexe der Atmungskette aufgebaut wird. Durch

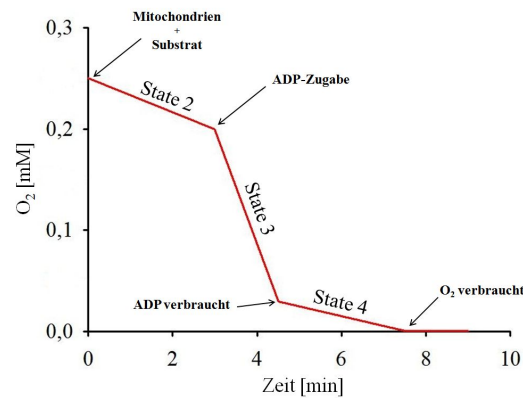


Abbildung 8: Schematischer Verlauf der Atmungskurve

Tabelle 3: Übersicht über die Substratzugabe

Substrat	Konzentration	Zugabe
Glutamat	1M	10µl
Palmitoylcarnitin + Malat	2mM / 0,5M	10 µl / 5µl
Pyruvat + Malat	1M / 0,5M	5µl / 5µl
Succinat + Rotenon	1M / 0,75mM	10µl / 5µl

die Zugabe des Entkopplers 2,4-Dinitrophenol (DNP) soll die Atmung unabhängig vom Protonengradienten und somit unabhängig von der ATP-Synthase untersucht werden. Hierzu wurde die entkoppelte Atmung mit den Substraten Glutamat und Succinat gemessen, DNP wurde dabei im Anschluss an die State 4 Atmung appliziert.

DNP wirkt als Proton-Ionophor und baut das chemiosmotische Potential, welches auf dem Protonengradienten zwischen Intermembranraum und Matrix beruht, ab, indem es Protonen aus dem Intermembranraum aufnehmen, durch die innere mitochondriale Membran in die Matrix diffundieren und dort die Protonen wieder abgeben kann. Das DNP diffundiert wieder in den Intermembranraum, wo der gleiche Prozess von neuem beginnt.

Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und des ADP/O Quotienten:

Die Bestimmung der State 2-, State 3- und State 4-Atmung wurde durch Anlegen von Tangenten an die jeweiligen Abschnitte der Kurve durchgeführt. Die Steigung

der Tangenten wurde mit dem Kalibrierungsfaktor der Sauerstoffelektrode multipliziert. Hieraus ergab sich der Sauerstoffverbrauch (nAtomeO/min) von 1 Unit eingesetzter Citratsynthase-Aktivität.

Der ADP/O-Quotient wurde nach der Methode von Estabrook (Estabrook 1967) aus den polarographischen Aufzeichnungen des Sauerstoffverbrauchs berechnet. Der vertikale Abstand der Schnittpunkte der Tangenten der State 2- und State 3-Atmung bzw. der State 3- und State 4-Atmung entsprach dem Sauerstoffverbrauch, der allein durch die Zugabe von ADP entstand. Aus der Menge des zugegebenen ADP (20µl, 10mM/l) und dem ermittelten Sauerstoffverbrauch lässt sich somit der ADP/O-Quotient berechnen, indem man das zugegebene ADP ins Verhältnis zu den verbrauchten Sauerstoffmolekülen setzt.

2.2.8 Messung der spezifischen Komplexaktivitäten

Aufbereitung der Proben:

1mg mitochondriales Protein wurde mit 200µl 5%iger Cholatlösung versetzt und mit MSM / EDTA-Puffer, dem 1µl/ml Protease-Inhibitor zugesetzt wurde, auf ein Endvolumen von 1ml aufgefüllt. MSM/EDTA Puffer setzt sich zusammen aus Mannitol (5mM), Sucrose (220mM), MOPS (5mM) und EDTA (2mM) eingestellt auf einen pH-Wert von 7,4. Anschließend wurden die aufbereiteten Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Am Tag der Messung wurden die Proben langsam aufgetaut und nochmals mit MSM/EDTA Puffer verdünnt. Für die Messung von Komplex I und III wurden die Proben auf 0,1mg/ml verdünnt und für Komplex IV auf 0,01mg/ml. Für die Messung von Komplex II wurde die unverdünnte Probe verwandt. Alle Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung der Pufferansätze für die einzelnen Komplexmessungen dargestellt. Alle Assays wurden in einem Photometer der Firma Biotek, auf einer 96-Well Platte durchgeführt. Jede Probe wurde einer Dreifachbestimmung unterzogen.

Um das Prinzip der einzelnen Komplexmessungen besser zu erklären, wurde für jede Messung eine schematische Zeichnung erstellt. Diese sollen das Verständnis der Messmethode erleichtern.

Komplex I - NADH-Dehydrogenase

Die Messung der Komplex I Aktivität beruht auf einem Protokoll von Janssen (Janssen et al. 2007).

Tabelle 4: Pufferansätze für die einzelnen Komplexmessungen

	Komplex I	Komplex II	Komplex III	Komplex IV
KH ₂ PO ₄	200mM	200mM	200mM	200mM
BSA	14,7g/l	14,7g/l	14,7g/l	-
DCIP	1,3mM	1,3mM	-	-
Decylubichinon	10mM	-	-	-
Antimycin A	0,11mM	0,11mM	-	-
Duroquinon	-	50mM	-	-
EDTA	-	100mM	100mM	-
Natriumazid	-	-	100mM	-
Cytochrom c	-	-	1mM	-
DDM	-	-	-	8,4mM

Versuchsdurchführung Die Mitochondrien wurden mit dem Puffer (Tabelle 4) auf eine 96-Well Platte pipetiert und für 3 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der Absorptionskurve unterteilte sich in drei Abschnitte. Zuerst wurde die Absorption ohne Substrat bestimmt, anschließend erfolgte die Zugabe von NADH und die substratmotivierte Aktivität wurde bestimmt. Durch die Zugabe von Rotenon wurde Komplex I inhibiert und somit der nicht Komplex I spezifische Substratabbau bestimmt.

Versuchsprinzip Das Substrat NADH wird durch die NADH - Dehydrogenase oxidiert und gibt Wasserstoff sowie Elektronen ab. Diese freigesetzten Elektronen reduzieren das zugegebene Decylubichinon zu Decylubichinol. Ohne einen weiteren Elektronenakzeptor würden sich die Elektronen am Decylubichinol stauen und rückwirkend Komplex I hemmen. Um dies zu verhindern und um die maximale Aktivität des Komplexes bestimmen zu können, wurde der Indophenol-Farbstoff 2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium (DCIP) zugegeben. Decylubichinol gibt seine Elektronen an DCIP weiter und reduziert diesen Farbstoff. Um eine Weitergabe der Elektronen an Komplex III zu verhindern, wurde dieser mit Antimycin A gehemmt (Abb. 9).

Komplex II - Succinatdehydrogenase

Das Protokoll für die Bestimmung der Komplex II Aktivität wurde mit leichten Veränderungen von Krähenbühl übernommen (Krahenbuhl et al. 1991).

Versuchsdurchführung Die unverdünnten Mitochondrien wurden mit dem Puffer (Tabelle 4) auf eine 96-Well Platte pipetiert und bei 37°C für 3min inkubiert. Es folgt eine Absorptionsmessung bei 600nm, um den Hintergrund zu bestimmen und nach Zugabe von Succinat, dem Substrat, eine weitere Messung, um die Aktivität zu bestimmen.

Versuchsprinzip Das zugeführte Substrat Succinat wird zu Fumarat oxidiert und gibt dabei Elektronen ab. Diese freigesetzten Elektronen reduzieren das zugegebene Decylubichinon zu Decylubichinol. Decylubichinol gibt die Elektronen weiter an den Farbstoff DCIP und dessen Reduktion kann photometrisch verfolgt werden (siehe Versuchsprinzip Komplex I). Um eine Weitergabe der Elektronen an Komplex III zu verhindern, wird dieser mit Antimycin A gehemmt (Abb. 10).

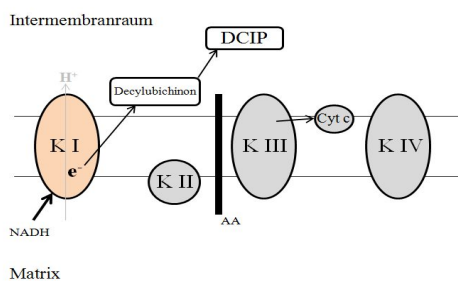


Abbildung 9: Bestimmung der Aktivität des Komplexes I

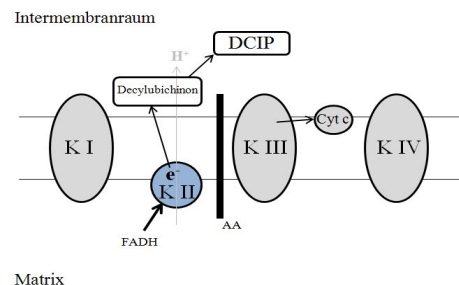


Abbildung 10: Bestimmung der Aktivität des Komplexes II

Komplex III - Cytochrom-c-Reduktase

Das Protokoll für die Bestimmung der Komplex III Aktivität wurde ebenfalls von Krähenbühl übernommen (Krahenbuhl et al. 1991).

Versuchsdurchführung Die Mitochondrien (0,1mg/ml) wurden zusammen mit dem Puffer (Tabelle 4) auf die 96-Well Platte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wurde die Absorption bei 550nm gemessen und somit die unspezifische Aktivität bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrates Decylubichinol, die Messung der substratmotivierten Aktivität sowie die Zugabe von Antimycin A und einer weiteren Absorptionsmessung.

Versuchsprinzip Um die Aktivität von Komplex III messen zu können, wurde ein Substrat zugegeben, welches oxidiert werden kann - Decylubichinol. Dies wurde hergestellt, indem Decylubichinon mit Hilfe von Kaliumborhydrid und Salzsäure zu Decylubichinol reduziert wurde. Komplex III oxidiert Decylubichinol und gibt die Elektronen weiter an Cytochrom

c. Dies liegt in der oxidierten Form vor und kann somit reduziert werden. Die Reduktion von Cytochrom c ruft einen Farbwechsel von rot zu farblos hervor. Um die Weitergabe der Elektronen von Cytochrom c zu Komplex IV zu verhindern, ist Natriumazid im Puffer enthalten. Das Azid-Ion blockiert die Sauerstoffbindungsstelle im aktiven Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase. Im Anschluss an die Aktivitätsmessung wird Antimycin A zugegeben, um die Komplex III-unspezifische Aktivität zu ermitteln (Abb. 11).

Komplex IV - Cytochrom c-Oxidase

Die Messung des Komplex IV erfolgte nach Wharton (Wharton u. Tzagoloff 1967).

Versuchsdurchführung Die Mitochondrien (0,01mg/ml) wurden zusammen mit dem Puffer (Tabelle 4) auf die 96-Well Platte pipettiert und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen. Um die substratmotivierte Aktivität des Komplexes zu bestimmen, wurde anschließend reduziertes Cytochrom c zugegeben und die Absorption gemessen.

Versuchsprinzip Reduziertes Cytochrom c wurde durch die reduzierende Eigenschaft des Ascorbates hergestellt. Dabei wurde oxidiertes Cytochrom c mit Ascorbat versetzt und somit reduziert. Um reines, reduziertes Cytochrom c zu erhalten, wurde das Cytochrom c/Ascorbat Gemisch auf eine Säule aufgetragen, welche mit Sephadex, ein Dextran, gefüllt war. Durch dieses Polysaccharid wurde das Ascorbat zurückgehalten und es war möglich, das reine, reduzierte Cytochrom c aufzufangen. Das applizierte reduzierte Cytochrom c gibt seine Elektronen an Komplex IV ab und wird somit oxidiert. Der Farbwechsel, von der reduzierten zur oxidierten Form, wurde photometrisch bestimmt und diente der Aktivitätsbestimmung (Abb. 12).

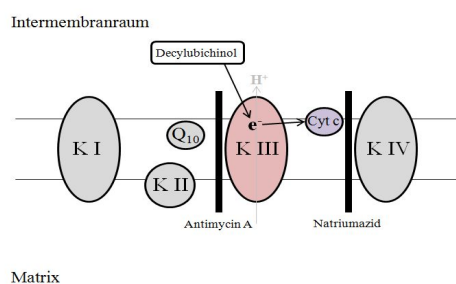


Abbildung 11: Bestimmung der Aktivität des Komplexes III

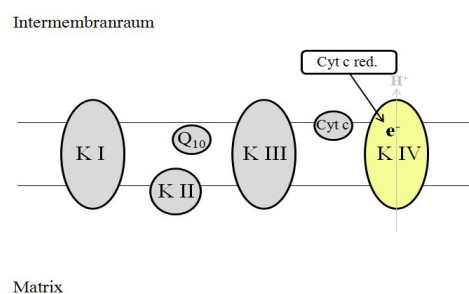


Abbildung 12: Bestimmung der Aktivität des Komplexes IV

2.2.9 RT-PCR

Die Untersuchung der Transkription bestimmter Zielgene wurde mit der TaqMan Real-time RT-PCR durchgeführt. Das gesamte Experiment gliedert sich in die RNA-Extraktion aus dem zu untersuchenden Gewebe, die Reverse Transkription und die Real-time PCR.

Um Gewebe für die Untersuchung der Gen- bzw. Proteinexpression zu erhalten, wurde eine weitere Serie Tiere operiert. Das entnommene Gewebe wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gekühlt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert.

RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit dem kommerziell erhältlichen Qiagen RNeasy Mini Kit durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 20-30mg gemörsertes Muskelgewebe in 0,3 ml RLT Puffer aufgenommen und für 2 x 10sec mit dem Ultraturrax T8 auf Stufe 2 homogenisiert. Anschließend wurden 590µl H₂O und 10µl Proteinase K (Qiagen) zugegeben und für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 10.000xg für 3 min wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß pipettiert, in dem 450µl Ethanol vorgelegt wurden. Nachdem die Probe gut durchmischt wurde, wurde sie auf eine Säule (RNeasy-Spin-Column) aufgetragen, die auf einem Zentrifugenröhrchen saß und für 15sec bei 8.000xg zentrifugiert. Hierbei wurde die RNA an der Silika-Gel-Membran der Säule adsorbiert, und die durch die Membran durchgetretene Flüssigkeit wurde verworfen. In einem ersten Waschschrift wurden 350µl RW1-Puffer auf die Säule aufgetragen und für 15sec bei 8000xg zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde auf jede Säule DNase, gelöst in RDD Puffer, pipettiert und bei Raumtemperatur für 15min inkubiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit RW1 sowie ein weiterer mit RPE Puffer, wobei die Säule bei 8.000xg für 15sec zentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte noch einmal die Zugabe von RPE Puffer sowie eine Zentrifugation der Säule für 1min bei 8.000xg. Die Säule wurde dann von dem Zentrifugenröhrchen abgenommen und auf einem neuen Gefäß angebracht. Schließlich wurden 50µl RNase-freies Wasser aufgetragen und für 1min bei 8.000xg zentrifugiert, um die adsorbierte RNA von der Membran zu lösen. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde mit dem gewonnenen Eluat wiederholt, um möglichst viel RNA von der Membran zu lösen. Direkt nach der RNA-Extraktion wurde der Nukleotid-Gehalt spektrophotometrisch bei 260/280nm bestimmt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und

das RNA-Extrakt bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die chemische Zusammensetzung der verwendeten Puffer kann der Firmenbeschreibung entnommen werden.

cDNA-Synthese

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde ein cDNA Synthese Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) verwendet. Für die Synthese der cDNA wurden $2\mu\text{g}$ isolierte RNA pro $10\mu\text{l}$ Wasser eingesetzt. Nach der Zugabe von $1\mu\text{l}$ *Random Hexamer Primer* pro $10\mu\text{l}$ erfolgte eine Inkubation für 5min bei 70°C . Nach der Inkubation wurde die Probe auf Eis gekühlt und es erfolgte pro $10\mu\text{l}$ die Zugabe von $4\mu\text{l}$ *5xReaction Buffer*, $1\mu\text{l}$ *Ribolock Ribonuclease Inhibitor* und $2\mu\text{l}$ *dNTP Mix* (10mM). Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 5min bei 25°C wurden $2\mu\text{l}$ *M-MuLV Reverse Transkriptase* pro $10\mu\text{l}$ zugegeben, so dass ein Endvolumen von $20\mu\text{l}$ erreicht wurde. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 25°C für 10 min und anschließend ein weiterer bei 37°C für eine Stunde. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 10min gestoppt und anschließend auf Eis gekühlt. Die so gewonnene cDNA wurde auf $1\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

Real-Time RT-PCR

Für die Durchführung der RT-PCR wurde zunächst der PCR-Reaktionsansatz hergestellt. In Tabelle 5 sind die Zugabemengen der einzelnen Komponenten pro $10\mu\text{l}$ Reaktionsansatz (Puffer + cDNA) dargestellt. Je $7,5\mu\text{l}$ PCR-Reaktionsansatz und $2,5\mu\text{l}$ cDNA wurden in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die pipettierte Mikrotiterplatte wurde anschließend bei $1000\times g$ für 1 min zentrifugiert und in ein Sequenzierungssystem (ABI Prism 9700 HT) eingebracht. Folgende Zyklusparameter wurden verwendet: initiale Denaturierung und Enzymaktivierung bei 95°C für 10 Minuten, dem folgten 40 Zyklen, welche sich aus einer Denaturierung bei 95°C für 15sec und anschließender Strangsynthese bei 60°C für 1min zusammensetzten.

Eine Standardreihe bestehend aus 5 verschiedenen mRNA-Konzentrationen (0,08; 0,4; 2; 10; 50 ng/ μl) wurde zur Quantifizierung verwendet. Als Bezugsgen wurde S29 verwandt, da die Expression dieses Gen zwischen den untersuchten Gruppen keine Unterschiede aufwies.

Primer Design

Tabelle 5: PCR Reaktionsansatz

Komponente	Zugabe pro 10µl Reaktion
H ₂ O	3,05µl
25mM MgCl ₂	2,00µl
10xPCR Puffer	1,00µl
10mM dNTP	0,80µl
Ampli Taq Gold	0,05µl
spezifische Sonde	0,20µl
Forward Primer	0,20µl
Reverse Primer	0,20µl
Endvolumen pro Primer	7,50µl
cDNA	2,50µl
Endvolumen	10,00µl

Primer sind synthetische Basen-Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Nukleotiden. Die Primer wurden so gewählt, dass sie antiparallel zueinander an die beiden Stränge der DNA binden. Sie haben eine Länge von 17-27 bp mit einem (G + C)-Gehalt von 50-60 % um die spezifische Anlagerung und die optimale Schmelztemperatur (50-70°C) zu erreichen. Vorwärts- sowie Rückwärts Primer wurden mit Hilfe des Universal Probe Library Assay Design Center entworfen. Die Spezifität der Primer wurde mit einer BLAST-Suche (Basic linear alignment search tool) überprüft.

2.2.10 Immunoblot

Um die Expression verschiedener Proteine quantitativ nachzuweisen, wurden SDS - Gelelektrophoresen und Western Blot Analysen durchgeführt.

Probenaufbereitung

Das zu untersuchende Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und bei -80°C aufbewahrt bzw. direkt weiterverarbeitet. Zirka 30mg des gemörserten Gewebes wurden in 450µl gekühlten IP-Puffer überführt und auf Eis aufbewahrt. Der IP-Puffer setzte sich zusammen aus: 1% Triton, 20mM Tris pH 7,5, 50mM NaCl, 25mM NaF, 12,5mM

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Zusätzlich wurden pro 10ml Ansatz Phenylmethanolsulfonylfluorid (10mg/ml), Na_3VO_4 (0,02mM) sowie eine Protease-Inhibitor Tablette (complete mini) hinzugefügt. Das überführte Gewebe wurde mit einem Dispergierwerkzeug für 1min homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 15min auf Eis wurde das Homogenat bei 16.000xg zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet wurde verworfen. Im Anschluss daran wurde der Proteingehalt des Überstandes bestimmt (Methode siehe Proteinbestimmung nach Bradford). Die weitere Probenaufarbeitung umfasste die Aliquotierung des isolierten Proteins sowie die Zugabe des 3x Lämmli-Puffers. Der Lämmli-Puffer setzte sich zusammen aus Ethylendiamintetraessigsäure - EDTA (Endkonzentration 3mM), Dithiothreitol - DTT (Endkonzentration 136mM), Tris-HCl (Endkonzentration 2,3mM), Natriumdodecylsulfat - SDS (Endkonzentration 35mM), Glycerin (Endkonzentration 40%) sowie Bromphenolblau (Endkonzentration 2%).

SDS-Gelelektrophorese

Anhand der SDS-Gelelektrophorese wurden die zu untersuchenden Proteine auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Verwendet wurden Gradientengele der Firma BioRad mit einem Gradientenfälle von 4-15%. Es wurde ca. 15µg Protein je Tasche geladen. Als Molekulargewichtstandard wurden Proteinleitern von Fermentas bzw. BioRad eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (200mM Glycin, 25mM Tris, 0,1% SDS) bei 20mA, nach der Einlaufphase bei 40mA pro Minigel durchgeführt.

Western Blot

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine mittels einer Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragen. Dazu wurde ein Transferpuffer (200mM Glycin; 25mM Tris; 0,1% SDS; 20% Methanol) verwandt und eine Stromstärke von 37mA pro Blot für 2 Stunden angelegt. Um zu testen, ob die Proteine vollständig aus dem Gel transferiert wurden, wurde das geblottete Gel mit 0,05% iger Coomassie-Lösung angefärbt.

Die Membran wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver in TBS-T (150mM NaCl; 50mM Tris; 0,1% Triton; pH 8,0) geblockt. Nachdem die Membran 3 x für je 10min mit TBS-T gewaschen wurde, erfolgte bei 4°C über Nacht die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (Mitoscience MS604 Total OXPHOS, 1:500). Anschließend erfolgten 3 Waschschrte mit TBS-T für je 10min. Entsprechend des Primärantikörpers wurde der Sekundärantikörper gewählt (Amersham Pharmacia

NXA931). Dieser wurde in TBS-T verdünnt (1:40000) und die Membran darin für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran folgten 3 Waschstschritte für je 10min mit TBS-T.

Die Detektion der peroxidasegekoppelten Antikörper erfolgte mittels Elektrochemilumineszenz. Dazu wurden die Reagenzien A (100mM Tris; 2,5mM Luminol; 0,4mM Kumarinsäure) und B (100mM Tris; 1,5% H₂O₂) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für 20sec darin inkubiert.

2.2.11 Blau-Native Gelelektrophorese

Die Blau-Native Gelelektrophorese, auch »BN-PAGE« genannt, wurde nach dem Protokoll von Wittig et al. (Wittig et al. 2006) durchgeführt. Sie dient der nativen Isolierung großer Proteinkomplexe aus biologischen Membranen und Gewebehomogenaten und kann in einer denaturierenden 2. Dimension fortgeführt werden, um den Aufbau von Proteinkomplexen zu untersuchen.

Da in dieser Arbeit membrangebundene Proteine aus Mitochondrien untersucht werden sollten, wurden die Proteine aus den zuvor isolierten Mitochondrien (siehe *Isolation von Mitochondrien*) aufbereitet. Hierzu wurden 400µg mitochondriales Protein mit 40µl Solubilisationspuffer (50mM NaCl, 50mM Imidazole, 2mM 6-Aminohexanoic acid, 1mM EDTA; pH 7) versetzt und mit einem Spatel gut durchmischt. Anschließend wurde Digitonin als Detergenz im Verhältnis 6 g/g (g Digitonin/g Protein) zugegeben und auf Eis für 20 min inkubiert. Digitonin wird als nichtionische Detergenz verwendet um die mitochondriale Membran aufzulösen und die Isolierung der Proteinkomplexe zu ermöglichen. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 50.000xg für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Glycerol (50%) und Coomassie Blue Lösung (5%), im Verhältnis Detergenz/Färbemittel 8 zu 1, wurden zum Überstand zugegeben und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Coomassie Blue ist in Wasser löslich, kann aber auch auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaft an Membranproteine binden. Die Bindung von vielen Farbstoffmolekülen erzwingt eine Ladungsänderung am Protein.

Die Proteine werden nicht nach ihrem Verhältnis Ladung zu Masse aufgetrennt, sondern nach ihrer Größe. Die Proteinmigration nimmt graduell mit der zurückgelegten Lauflänge und der abnehmenden Porengröße des Gradientengeles ab.

Für die Gelelektrophorese wurden vorgefertigte Gradientengele von Serva (3-12%) verwendet. Diese wurden zusammen mit einer Serva Gelelektrophoreseeinheit (Blue

vertical 101) verwendet. Die Elektrophoresekammer wurde mit Kathodenpuffer B (50mM Tricin, 7,5mM Imidazol, 0,02% Coomassie blue; pH 7,0) sowie Anodenpuffer (25mM Imidazol; pH 7,0) befüllt. Nach dem Beladen des Gels mit den aufbereiteten Proteinen, wurde die Elektrophorese gestartet. Da keine denaturierenden Stoffe, wie SDS, der Elektrophorese zugefügt wurden, sollten alle Proteinkomplexe erhalten bleiben. Nachdem die Laufront etwa 1/3 der Laufrdistanz zurückgelegt hatte, wurde der Kathodenpuffer B durch Kathodenpuffer B/10 (50mM Tricin, 7,5mM Imidazol, 0,002% Coomassie blue; pH 7,0) ersetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit 10%iger Essigsäure entfärbt und ausgewertet.

2.2.12 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Streuung und Reflektion von optischen Signalen, wenn Partikel einen Laserstrahl passieren. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Partikel mittels einer Kapillare im Sensormodul einzeln an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Die Partikel streuen einen Teil des Lichtes, welches mittels Detektoren nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe des Partikels und seiner Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen des Partikels ab. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Komplexität des Partikels beeinflusst wird (Dabkowski et al. 2009).

Um die Beschaffenheit der Mitochondrien bestimmen zu können, wurden diese isoliert (siehe Abschnitt *Isolation der Mitochondrien*) und mit KME-Puffer verdünnt. Nach der Messung der optischen Signale erfolgte die Auswertung der Daten mittels eines Punktwolkediagrammes, indem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht als Ordinate und Abszisse aufgetragen wurden.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler (Standard error of the mean - SEM) angegeben. Nach Prüfung der Normalverteilung wurde ein zweiseitiger Student-t-Test für den Vergleich Sham zu TAC verwandt. Bei der Bestimmung der Durchflusszytometrie wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Diese wurde mit dem Holm-Sidak Test als Post-hoc-Test kombiniert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

Tabelle 6: Nukleotidsequenzen der entworfenen Forward und Reverse Primer

Gen	Prime	Nukleotidsequenz
PGC-1 α	Forward	CTG CGG GAT GAT GGA GAC A
	Reverse	GCG AAA GCG TCA CAG GTG TAA
	Sonde	6-FAM-CTA TGG TTT CAT CAC CTA CC-MGB
PGC-1 β	Forward	GCC CTG ATG ATT CCG AGT TC
	Reverse	TTG GTA AGC GCA GCC AAG A
	Sonde	6-FAM-TGA CAG TGA GAA TGA AGC T-TAMRA
NRF-1	Forward	GAA GAT CAG CAG ACA CAA ACT CA
	Reverse	TGC CCC AGT ACC AAC CTG
	Sonde	#39
NRF-2	Forward	TCC AGC ATC AGT GCC TTC TG
	Reverse	TAG CTG CCT TTG CGC TAC TGT
	Sonde	6-FAM-TAC GCC GAC TAC TAT TAA G-MGB
ERR α	Forward	CCT GGT CTG TGG GGA TGT
	Reverse	GGA CAG CTG TAC TCG ATG CTC
	Sonde	#50
Komplex I	Forward	GGA TGA TCG GAC CTT TCA CA
	Reverse	GAC GGT CGT GTA ATT CAG CA
	Sonde	#89
Komplex II	Forward	CCA AGG GTC TGA ATC CAG GAA
	Reverse	TCT CCT TGT AGG TCG CCA TCA
	Sonde	6-FAM-CAA TTG CAG AAA TCA A-MGB
Komplex III	Forward	AAG ATC ACC CGT GGA ATT GA
	Reverse	TTC CCT TGT TGC AGT CAC AC
	Sonde	#119
Komplex IV	Forward	GCC TTT CCA GGG ATG AGA AAG
	Reverse	TCT CAG CGA AGC TCT CGT TAA A
	Sonde	6-FAM-CCA ATT GTA CCG CAT CC-MGB
Komplex V	Forward	TGC ATG GAC TGA GGA ACG
	Reverse	CCA AGT TCA GGG ACA TAC CC
	Sonde	#73
ANT 1	Forward	GTA GGA TGA TGA TGC AGT CTG G
	Reverse	CGT CCT TCA TCT TTT GCA ATC
	Sonde	#67

Kapitel 3

Ergebnisse

Im nachfolgendem Ergebnisteil werden die Tiere die eine Aortenstenose erhalten haben, als TAC Tiere bezeichnet und Tiere, die einer Scheinoperation unterzogen wurden, als Sham Tiere. Die operierten Tiere, TAC sowie Sham, wurden zu den definierten Zeitpunkten (2, 6, 10 Wochen) willkürlich ausgewählt und für die jeweiligen Versuche verwendet. Um eine systolische Dysfunktion festzustellen, wurde ab der 12. postoperativen Woche wöchentlich eine Ultraschalluntersuchung durchgeführt. Eine systolische Dysfunktion des Herzens wurde definiert als eine Verkürzungsfraction (Fractional Shortening) unter 30%. Diese Störung der kardialen Kontraktilität des Herzens trat innerhalb der 15. bis 25. postoperativen Woche auf (MW 20 Wochen).

3.1 Morphometrische Parameter

Die Aortenzügelung wurde von den Tieren gut toleriert. Es bestand eine perioperative Sterblichkeitsrate von 5%. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden die Tiere gewogen sowie die Organgewichte von Herz, Lunge und Leber bestimmt. In Tabelle 7 sind die absoluten Gewichte sowie die Länge der Tibia aufgelistet. In Abbildung 13 sind die Herz-, Ventrikel-, Lungen- und Lebergewichte, bezogen auf das Körpergewicht, dargestellt. Das Körpergewicht der TAC- und der Sham Tiere war zu keinem Untersuchungszeitpunkt voneinander verschieden. Auch die Tibialänge, als Altersmarker, wies keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Dies lässt darauf schließen, dass die Aortenstenose keine Wachstumsbeeinträchtigung nach sich zog. Ein Bezug der absoluten Parameter (Herz-, Ventrikel-, Leber- und Lungengewicht) auf die Tibialänge erbrachte die gleichen Ergebnisse wie der Bezug auf das Körpergewicht.

Das absolute Herzgewicht (Tab.: 7) sowie das Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht (Abb.: 13 A)) waren bereits nach 2 Wochen Drucküberlastung signifikant erhöht. Diese Erhöhung blieb für den gesamten Untersuchungszeitraum bestehen. Des Weiteren zeigte auch das Verhältnis Ventrikelgewicht zu Körpergewicht (Abb.: 13 B)) eine signifikante Erhöhung ab der 2. postoperativen Woche. In Abbildung 13 C) ist das relative Lungengewicht in Bezug auf das Körpergewicht abgebildet. Ab der 6. postoperativen Woche zeigte sich eine signifikante Erhöhung dieses Verhältnisses. Auch das absolute Gewicht der Lunge folgte diesem Trend. Das Verhältnis Lebergewicht zu Körpergewicht (Abb.: 13 D)) sowie das absolute Lebergewicht (Tab.: 7) blieben über den gesamten Versuchszeitraum unverändert. Das erhöhte Lungengewicht sowie das unveränderte Lebergewicht deuten auf eine sich entwickelnde Linksherzinsuffizienz hin.

Etwa 15% der nach 6 Wochen untersuchten TAC Tiere wiesen Pleuraergüsse auf. Dieser Anteil erhöhte sich mit zunehmender Dauer der Drucküberlastung. Nach 10 Wochen litten zirka 33% und nach 20 Wochen mehr als 75% der operierten TAC Tiere an Pleuraergüssen.

3.2 Echokardiografische Parameter

Zu den gewählten Zeitpunkten wurde zunächst die systolische Funktion der Tiere ermittelt und im Anschluss daran die diastolische Funktion. Die systolische Funktion gibt Auskunft über die Kontraktilität und die Auswurfleistung des Ventrikels. Die diastolische Funktion lässt eine Beurteilung der linksventrikulären Füllung zu. Die gemessenen Parameter sind in Tabelle 8 und in Abbildung 15 dargestellt.

Die Aortenkonstriktion hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Herzrate. Mit zunehmenden Alter nahm die Herzrate in beiden Gruppen ab (Tab. 8). Bereits 2 Wochen nach Induktion der Aortenkonstriktion konnte eine deutliche Hypertrophie des linken Ventrikels festgestellt werden. Dies ist gezeigt anhand der Gesamtwanddicke (Abb. 15 A)) sowie der Hinterwand- und Vorderwanddicke (Tab. 8). Die Hypertrophie blieb während des gesamten Untersuchungszeitraumes bestehen. Der Durchmesser des linken Ventrikels (LVEDD) war in den TAC Tieren zum 2W-Zeitpunkt stark verringert, ein Anzeichen für das Entstehen einer konzentrischen Hypertrophie (Abb. 15 B)). Nach 20 Wochen kardialer Drucküberlastung konnte eine Dilatation des linken Ventrikels anhand einer Zunahme des linksventrikulären Durchmessers gezeigt werden. Die Kontraktilität des linken Ventrikels kann anhand der Ejektionsfraktion (Tab. 8) und des Fractional Shortenings

Tabelle 7: Morphometrische Parameter operierter Tiere nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung

Parameter	2 Wochen		6 Wochen		10 Wochen		20 Wochen	
	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC
Körper- gewicht	122 ± 3,04	116 ± 2,25	246 ± 4,57	258 ± 4,21	343 ± 4,49	332 ± 5,39	406 ± 4,31	412 ± 5,42
Herz- gewicht	465 ± 13,9	789 ± 37,4 ‡	874 ± 21,4	1577 ± 42,6 ‡	1095 ± 18,2	2015 ± 74,5 ‡	1258 ± 31,1	2477 ± 85,7 ‡
Lungen- gewicht	816 ± 85,8	917 ± 38,7	1257 ± 18,8	2803 ± 144 ‡	1615 ± 45,9	4338 ± 237 ‡	1674 ± 46,7	4690 ± 224 ‡
Leber- gewicht	5,19 ± 0,73	5,47 ± 0,17	10,3 ± 0,49	11,2 ± 0,31	11,6 ± 0,41	10,6 ± 0,31	11,7 ± 0,36	12,7 ± 0,41
Tibia- länge	26,0 ± 0,53	25,3 ± 0,14	33,1 ± 0,26	33,5 ± 0,19	37,3 ± 0,38	37,8 ± 0,17	40,1 ± 0,38	41,1 ± 0,28

Mittelwert ± SEM; ‡p < 0,05; †p < 0,001 vs. Sham

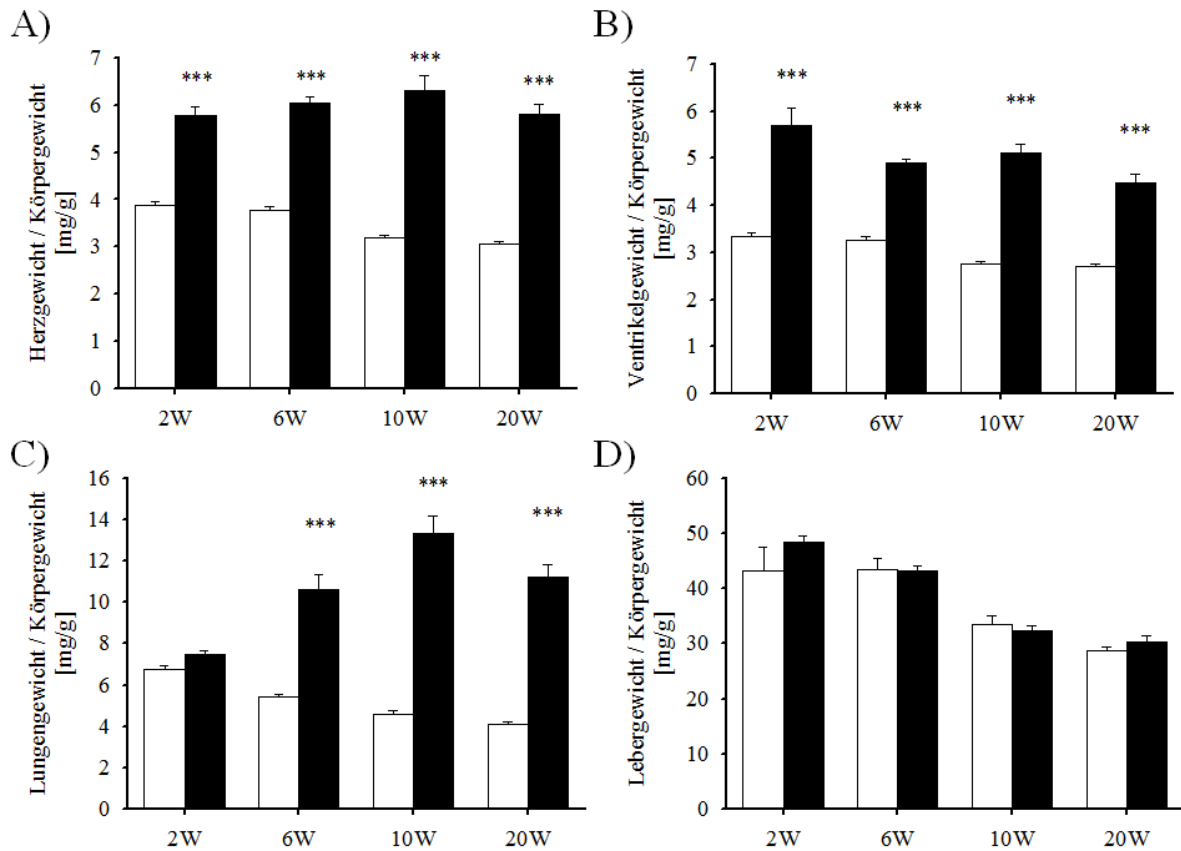


Abbildung 13: Relative Herz-, Ventrikel-, Lungen- und Lebergewichte von Sham (weiße Balken) und TAC (schwarze Balken) Tieren nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung; A) Herz-zu-Körpergewicht; B) Ventrikel-zu-Körpergewicht; C) Lungen-zu-Körpergewicht; D) Leber-zu-Körpergewicht; Mittelwert \pm SEM; ***p < 0,001 vs. Sham

(Abb. 15 C)) beurteilt werden. Zum 2W-Zeitpunkt war die Kontraktilität des linken Ventrikels in den TAC Tieren deutlich erhöht. Während die Kontraktilität in den Sham Tieren innerhalb des Untersuchungszeitraumes konstant blieb, nahm sie in den TAC Tieren ab der 2. postoperativen Woche deutlich ab. Nach durchschnittlich 20 Wochen sank die Verkürzungsfraction (Fractional Shortening) auf unter 30%, dies entspricht laut Definition einer systolischen Dysfunktion. Mittels Pulsed-Wave- und Tissue-Doppler wurde die Einstromgeschwindigkeit des Blutes durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel sowie die Ventrikelbewegung am septalen Mitralanulus gemessen. In Tabelle 8 sind die einzelnen Parameter aufgelistet. Ab der 6. postoperativen Woche veränderte sich die diastolische Funktion, indem die Geschwindigkeit des passiven Einstroms (E) zunahm, während die Geschwindigkeit des aktiven Einstroms (A) abnahm. Auch im Tissue-Doppler

konnte diese Entwicklung verfolgt werden. Ab dem 6W-Zeitpunkt verringerte sich die Myokardbewegung während des passiven (E') und des aktiven (A') Einstromes. Um die diastolische Funktion besser beurteilen zu können, werden bestimmte Verhältnisse einzelner Parameter zueinander betrachtet. So zeigen die Verhältnisse E/E' (Tab. 8), E/A und E/DT (Abb. 15 D)+E)), dass bereits ab der 6. postoperativen Woche eine deutliche Veränderung der diastolischen Funktion vorlag. Zur Beurteilung der diastolischen Funktion sollten Druckverhältnisse hinzugezogen werden. Die Doppler-Echokardiographie ist aber nur in der Lage Geschwindigkeiten zu messen. Nur durch die Anwendung einer Gleichung, wie zum Beispiel der Nagueh-Formel ($1,9 + (1,24 * E/E') = PCWP$), ist es möglich, einen Druckgradienten abzuschätzen. In Abbildung (Abb. 15 F)) ist der Verschlussdruck, berechnet nach der Nagueh-Formel, dargestellt. Auch dieser Parameter zeigt eine deutliche Zunahme ab der 6. postoperativen Woche.

In Abbildung 14 sind Aufnahmen der echokardiografischen Untersuchung exemplarisch gezeigt, anhand derer sich die morphologischen Veränderungen im Herzen nachvollziehen lassen. Im linken Bild ist die echokardiografische Aufnahme eines Kontrolltieres zu sehen. Die Wanddicke sowie der Durchmesser des Ventrikels sind unauffällig. Im mittleren Bild ist die Wanddicke stark erhöht, dies spricht für eine ausgeprägte Hypertrophie des Ventrikels. Im rechten Bild ist die echokardiografische Aufnahme eines insuffizienten Herzens zu sehen. Die Wand ist weiterhin verdickt, jedoch ist der Durchmesser des Ventrikels stark vergrößert. Des Weiteren ist die Kontraktilität des Herzens stark vermindert.

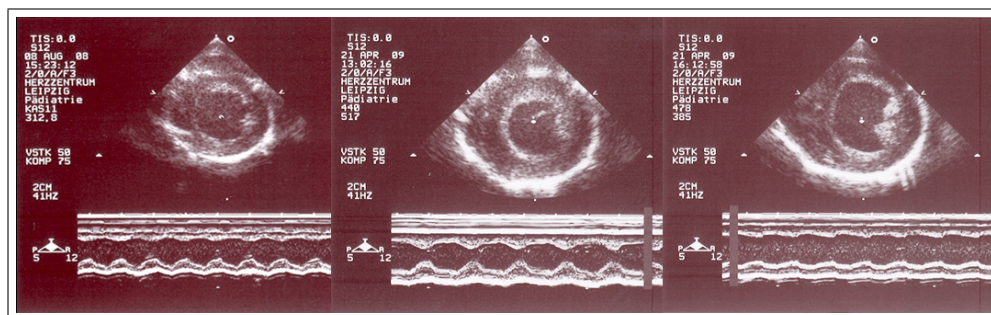


Abbildung 14: Repräsentative Schnitte der kurzen Achse des linken Ventrikels im transthorakalen Echokardiogramm von Kontrolltieren (links) und Tieren 6 (mitte) und 20 Wochen (rechts) nach Aortenzügelung.

Tabelle 8: Parameter zur Klassifizierung der Herzfunktion nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung.

	2 Wochen			6 Wochen			10 Wochen			20 Wochen		
	Sham	TAC	Sham	Sham	TAC	Sham	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC
HR	423 ± 7	454 ± 8 †	368 ± 7	363 ± 7	342 ± 7	342 ± 9	342 ± 13	339 ± 10	324 ± 11			
LVVW	1,36 ± 0,06	1,79 ± 0,02 ‡	1,48 ± 0,05	2,03 ± 0,10 ‡	1,70 ± 0,10	2,58 ± 0,27 †	1,64 ± 0,06	2,43 ± 0,13 ‡				
LVHW	1,50 ± 0,04	1,77 ± 0,05 ‡	1,74 ± 0,005	7,02 ± 0,37 ‡	1,75 ± 0,08	2,65 ± 0,32 †	2,06 ± 0,07	2,81 ± 0,22 †				
EF	74,0 ± 1,4	89,5 ± 1,5 ‡	83,9 ± 2,7	73,1 ± 5,9	76,9 ± 6,5	65,7 ± 3,1 †	79,1 ± 1,4	48,6 ± 1,6 ‡				
E	943 ± 29	911 ± 19	1045 ± 44	1230 ± 55 †	1019 ± 40	1139 ± 128	895 ± 65	1260 ± 59 †				
A	508 ± 46	525 ± 66	737 ± 44	355 ± 72 †	704 ± 68	254 ± 91 †	432 ± 57	99,8 ± 17,5 ‡				
DT	31,5 ± 1,6	30,6 ± 1,8	32,9 ± 2,3	26,0 ± 2,6 †	37,5 ± 3,0	26,3 ± 4,8	41,0 ± 4,3	27,7 ± 2,7 †				
E'	52,5 ± 2,3	42,1 ± 3,7 †	56,5 ± 3,2	46,2 ± 2,6 †	58,1 ± 1,4	36,9 ± 2,2 ‡	61,2 ± 4,2	43,8 ± 3,7 †				
A'	33,1 ± 1,93	33,5 ± 7,9	39,8 ± 2,6	24,0 ± 2,6 †	40,7 ± 2,5	20,7 ± 1,3 ‡	40,1 ± 1,5	22,6 ± 3,5 †				
E/E'	18,5 ± 1,1	23,3 ± 2,2	19,0 ± 1,3	27,4 ± 2,2 †	17,4 ± 1,0	32,0 ± 5,5 †	14,6 ± 1,5	29,2 ± 1,3 ‡				

Echokardiografische Parameter: HR - Herzrate [Schläge/min]; LVVW - linksventrikuläre Vorderwand [mm]; LVHW - linksventrikuläre Hinterwand [mm]; EF - Ejektionsfraktion [%]; E - frühdiastolische, passive LV-Füllung [cm/s]; A - spät-diastolische, aktive LV-Füllung [cm/s]; DT - Dezelerationszeit der E-Welle [ms]; E' - frühdiastolische Mitralanulargeschwindigkeit [cm/s]; A' - spät-diastolische Mitralanulargeschwindigkeit [cm/s]; E/E' - Verhältnis zwischen den maximalen Geschwindigkeiten des passiven Mitraleinstrom (E, mittels PW-Doppler) und der frühdiastolischen Mitralanulargeschwindigkeit (E', mittels TDI)

Mittelwert ± SEM; † p < 0,05; ‡ p < 0,001

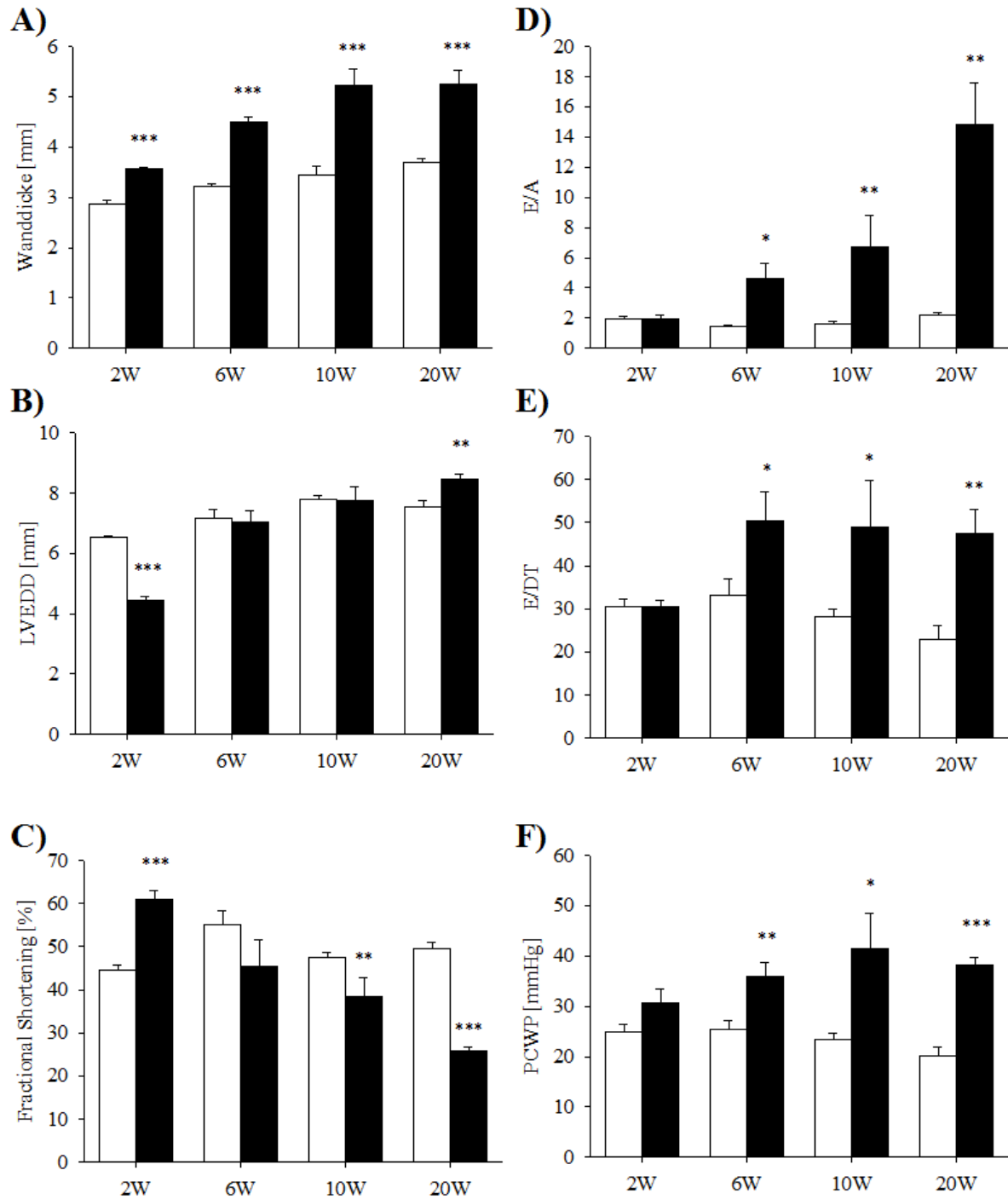


Abbildung 15: Echokardiografische Parameter von Sham (weiße Balken) und TAC (schwarze Balken) Tieren nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung; A) Wanddicke; B) LVEDD - Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser; C) Fractional Shortening; D) E/A - Verhältnis von E zu A Welle; E) E/DT - Verhältnis E zu DT; F) PCWP - Verschlussdruck; Mittelwert \pm SEM; ***p < 0,001 **p < 0,01 *p < 0,05 vs. Sham

3.3 Morphometrie der Skelettmuskulatur

Im Menschen und auch in einigen Tiermodellen wurde begleitend zu einer Herzinsuffizienz eine Atrophie der Skelettmuskulatur gezeigt. In Tabelle 9 sind die absoluten Muskelgewichte des Gastrocnemius und des Soleus Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung gezeigt. Eine Erniedrigung des absoluten Muskelgewichtes, welches auf eine Atrophie hinweisen würde, wurde zu keinem Untersuchungszeitpunkt festgestellt. Weiterhin wurde das relative Muskelgewicht in Form des Atrophieindexes ermittelt. Eine Abnahme dieses Indexes würde für einen Schwund an Muskelmasse sprechen, eine Erhöhung für eine Hypertrophierung des Muskels. Abbildung 16 zeigt den errechneten Atrophieindex für den Gastrocnemius Muskel (A) und den Soleus Muskel (B). Nach 6 Wochen Drucküberlastung wies der Gastrocnemius eine Abnahme an Muskelmasse und der Soleus eine Zunahme an Masse, im Vergleich zur Kontrolle, auf. Die anderen Zeitpunkte waren unverändert. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass ein Oedem eine mögliche Atrophie maskiert, wurde das Verhältnis Feucht-zu-Trockengewicht (Tab.: 9) bestimmt. Eine Erhöhung des Wertes im Vergleich zur Kontrolle, würde für eine Wassereinlagerung in den unteren Extremitäten sprechen. Jedoch zeigte das Verhältnis Feucht-zu-Trockengewicht keine eindeutigen Veränderungen, somit ist eine Wassereinlagerung in den unteren Extremitäten als unwahrscheinlich anzunehmen.

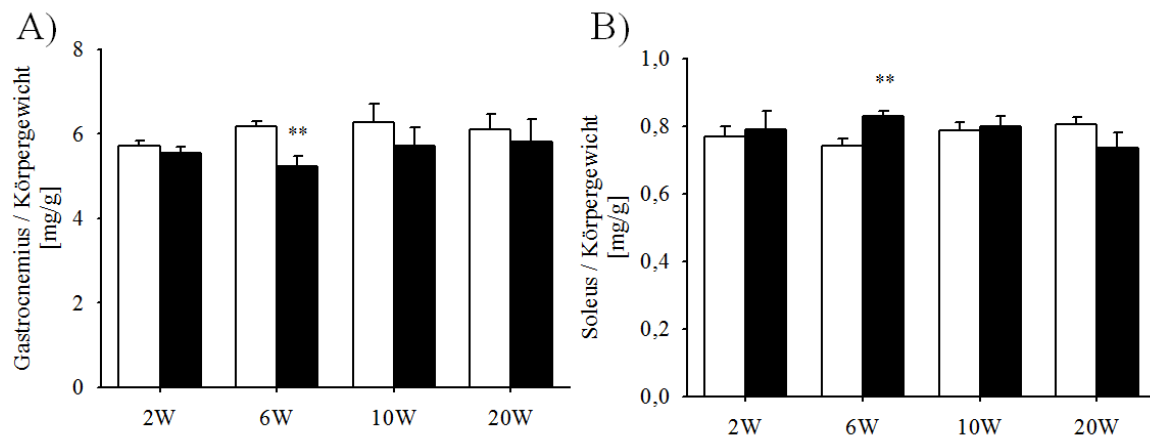


Abbildung 16: Verhältnis Muskelgewicht-zu-Körpergewicht - Atrophieindex im Gastrocnemius (A) und Soleus (B) in Sham (weiße Balken) und TAC (schwarze Balken) Tieren nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung; Mittelwert \pm SEM; **p < 0,01 vs. Sham

Tabelle 9: Absolute Muskelgewichte und das Verhältnis Feucht-zu-Trockengewicht

		Gastrocnemius		Soleus	
		Sham	TAC	Sham	TAC
2 W	Gewicht [mg]	777 ± 50,3	649 ± 12,6	92,1 ± 4,01	91,2 ± 6,44
6 W	Gewicht [mg]	1446 ± 43,7	1257 ± 189	161 ± 8,82	217 ± 9,51 ‡
10 W	Gewicht [mg]	2332 ± 167	1987 ± 166	273 ± 13,1	258 ± 10,4
20 W	Gewicht [mg]	2395 ± 162	2330 ± 184	329 ± 7,85	316 ± 16,4
2 W	F/T	4,76 ± 0,04	4,72 ± 0,14	4,81 ± 0,11	4,75 ± 0,11
6 W	F/T	5,03 ± 0,19	4,38 ± 0,09 †	7,02 ± 0,79	5,68 ± 0,52
10 W	F/T	4,44 ± 0,10	4,29 ± 0,08	4,45 ± 0,08	5,33 ± 0,55
20 W	F/T	4,36 ± 0,06	4,27 ± 0,04	4,16 ± 0,10	4,32 ± 0,23

Mittelwert ± SEM; †p < 0,05; ‡p < 0,001 vs. Sham

F/T - Verhältnis Feucht-zu-Trockengewicht; W - Wochen

3.4 Mitochondriale Funktion

3.4.1 Gehalt an mitochondrialem Protein

Der Proteingehalt wurde im Homogenat sowie in den isolierten Mitochondrien bestimmt. In Tabelle 10 sind die Proteinmengen des Homogenates sowie der isolierten Mitochondrienpopulationen für das Herz sowie beide Skelettmuskel angegeben. Der Proteingehalt wird in mg/ml angegeben, dies bezieht sich auf den Proteingehalt in mg pro ml Homogenat bzw. isolierter Mitochondrien. Der Proteingehalt im Homogenat des Herzens war zu den Untersuchungszeitpunkten 2, 6 und 10 Wochen unverändert, zum Zeitpunkt 20 Wochen, im Vergleich zur Kontrolle, leicht erniedrigt. In den isolierten Mitochondrien des Herzens zeigten sich keine Unterschiede im Proteingehalt.

Im Homogenat des Gastrocnemius und des Soleus Muskels sowie in den isolierten Mitochondrien des Soleus war der Proteingehalt unverändert. In den isolierten Mitochondrien des Gastrocnemius war nach 10 Wochen eine Reduktion zu sehen, welche sich nach 20 Wochen wieder normalisierte.

Tabelle 10: Proteingehalt [mg/ml] im Homogenat und in den isolierten Mitochondrien des Herzens, des Gastrocnemius Muskels und des Soleus Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung.

	2 Wochen			6 Wochen			10 Wochen			20 Wochen		
	Sham	TAC	Sham	Sham	TAC	Sham	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC
Herz	Hom	8,05 ± 1,64	10,9 ± 0,87	10,4 ± 0,79	10,3 ± 0,79	13,8 ± 1,40	13,3 ± 1,20	14,4 ± 3,50	18,5 ± 1,78	9,17 ± 0,42 †		
	IFM	7,75 ± 2,41	10,1 ± 1,50	10,5 ± 1,12	11,8 ± 0,75	17,7 ± 2,05	12,7 ± 0,71	12,7 ± 0,71	14,3 ± 3,50			
	SSM	2,69 ± 1,01	3,48 ± 1,63	4,27 ± 0,87	8,84 ± 1,75	7,77 ± 2,23	13,4 ± 2,08	7,22 ± 1,81	9,13 ± 1,59			
Gastro	Hom	10,9 ± 0,96	14,2 ± 2,22	10,3 ± 0,72	11,8 ± 0,41	11,9 ± 0,96	12,3 ± 1,31	12,0 ± 0,92	10,8 ± 1,04			
	IFM	8,57 ± 0,86	11,0 ± 1,48	11,0 ± 0,77	9,64 ± 1,24	11,7 ± 0,42	9,37 ± 0,50 †	12,3 ± 1,88				
	SSM	4,11 ± 0,96	3,43 ± 0,77	3,31 ± 0,44	5,17 ± 0,90	4,07 ± 0,90	4,37 ± 0,88	3,52 ± 0,49				
Soleus	Hom	16,4 ± 1,48	17,4 ± 1,59	16,1 ± 0,82	16,6 ± 0,85	19,6 ± 0,35	17,2 ± 1,18	19,9 ± 1,23				
	IFM/SSM	6,81 ± 0,66	8,72 ± 1,24	6,93 ± 0,74	7,72 ± 1,39	7,56 ± 0,83	5,18 ± 1,03	8,26 ± 1,01	9,68 ± 1,83			

Mittelwert ± SEM in [mg/ml]; † p < 0,05; ‡ p < 0,001
Gastro - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarkolemale Mitochondrien; Hom - Homogenat

3.4.2 Citratsynthase

Die Citratsynthase (CS) ist ein Enzym, welches die Kondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat katalysiert. Da die CS nur in den Mitochondrien lokalisiert ist, gilt sie als das mitochondriale Leitenzym. Eine Einheit (1 Unit) Citratsynthase-Aktivität entsprach unter Versuchsbedingungen einem Umsatz von 1 μmol Acetyl-CoA/min.

In Tabelle 11 ist die Gesamt-Citratsynthase-Aktivität im Homogenat sowie in den isolierten Mitochondrien angegeben. Die Gesamtaktivität der CS setzt sich aus der freien und der latenten CS zusammen.

Im Homogenat des Herzes war die CS-Aktivität nach 2 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung signifikant erniedrigt. An den dazwischen liegenden Untersuchungszeitpunkten war sie unverändert im Vergleich zur Kontrolle. In den isolierten IFM des Herzens unterschied sich die CS-Aktivität zu keinem Untersuchungszeitpunkt von den Sham Tieren. Die SSM des Herzens zeigten zu Beginn (2W) eine signifikante Erniedrigung der CS-Aktivität, ab der 6. postoperativen Woche jedoch eine deutliche Erhöhung der CS-Aktivität, welche sich bis in die kontraktile Dysfunktion fortsetzte.

Die Citratsynthase-Aktivität im Gastrocnemius war zu jedem Untersuchungszeitpunkt gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Dies äußerte sich sowohl im Homogenat als auch in den isolierten Mitochondrien. Im Homogenat zeigte sich eine signifikante Erniedrigung nach 2, 6 und 20 Wochen, in den isolierten Mitochondrien nach 2, 10 und 20 Wochen.

Im Homogenat des Soleus Muskels war die CS-Aktivität deutlich nach 2 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung reduziert. Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten sowie in den isolierten Mitochondrien zeigte sich keine Veränderung der CS-Aktivität.

Tabelle 11: Citratsynthase-Aktivität in den isolierten Mitochondrien des Herzens, des Gastrocnemius Muskels und des Soleus Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung.

		2 Wochen		6 Wochen		10 Wochen		20 Wochen	
Herz	Hom	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC
		13,2 ± 1,00	9,93 ± 0,83 †	11,1 ± 1,62	10,3 ± 0,77	17,5 ± 1,54	12,5 ± 1,79	12,4 ± 1,18	8,06 ± 1,01 †
	IFM	24,6 ± 1,54	21,4 ± 1,79	34,6 ± 6,48	32,1 ± 2,84	38,6 ± 2,46	42,8 ± 1,88	29,0 ± 2,19	32,9 ± 2,51
	SSM	9,81 ± 0,75	6,08 ± 0,41 †	11,9 ± 1,12	23,0 ± 2,07 †	16,3 ± 1,75	27,1 ± 2,09 †	14,5 ± 1,32	25,7 ± 2,20 †
Gastro	Hom	4,31 ± 0,23	2,81 ± 0,33 †	4,83 ± 0,35	2,62 ± 0,17 †	4,24 ± 0,38	3,61 ± 0,67	4,13 ± 0,55	2,55 ± 0,37 †
	IFM	24,7 ± 2,04	18,6 ± 0,63 †	22,2 ± 1,27	19,4 ± 0,67	26,1 ± 1,41	20,6 ± 1,10 †	20,6 ± 1,10	16,0 ± 1,38 †
	SSM	11,8 ± 1,39	4,08 ± 0,46 †	9,81 ± 0,96	7,57 ± 0,64	12,6 ± 1,20	7,53 ± 0,57 †	11,0 ± 1,34	6,84 ± 0,68 †
	Soleus	4,77 ± 0,34	3,01 ± 0,23 †	4,75 ± 0,36	3,94 ± 0,31	4,99 ± 0,33	5,62 ± 0,31	4,22 ± 0,20	2,97 ± 0,26 †
Soleus	IFM/SSM	5,84 ± 0,32	4,87 ± 0,61	5,52 ± 0,73	4,94 ± 0,35	4,87 ± 0,28	4,70 ± 0,33	4,07 ± 0,33	3,68 ± 0,26
	Mittelwert ± SEM in U/ml; † p < 0,05; ‡ p < 0,001								
Gastro - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarkolemmale Mitochondrien; Hom - Homogenat									

3.4.3 Mitochondriale Ausbeute

Die mitochondriale Ausbeute gibt wieder, wie viel der eingesetzten Mitochondrien im Homogenat am Ende getrennt isoliert werden konnten. Verfahrensschwankungen würden hier sehr deutlich auffallen und sich in einer verringerten Ausbeute widerspiegeln. Die mitochondriale Ausbeute wurde mittels der Citratsynthase ermittelt. Errechnet wurde der prozentuale Anteil der eingesetzten Citratsynthase Aktivität im Homogenat, welcher in den isolierten Mitochondrien wiedergefunden wurde. Abbildung 17 zeigt die mitochondriale Ausbeute im Herz- und Skelettmuskel. Die dargestellte mitochondriale Gesamtausbeute repräsentiert die Summe der einzelnen Ausbeuten der getrennt isolierten mitochondrialen Populationen (IFM + SSM). Die mitochondriale Ausbeute im Herzen war nach 2 und 6 Wochen Aortenzügelung signifikant erhöht, im Vergleich zu den Sham Tieren. Zu den Untersuchungszeitpunkten 10 und 20 Wochen ließen sich jedoch keine Veränderungen bezüglich der Ausbeute im Herzmuskel feststellen. Die errechneten Ausbeuten für den Gastrocnemiusmuskel sowie den Soleusmuskel unterschieden sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt zwischen Sham und TAC Tieren. Die Ausbeuten blieben auch im Zeitverlauf annähernd gleich.

3.4.4 Citratsynthase-Quotient

Tabelle 12 zeigt den Citratsynthase-Quotienten (CSR) für die isolierten Mitochondrien des Herzens, des Gastrocnemius und des Soleus Muskels. Der CSR wird aus der latenten und der freien Citratsynthase berechnet und dient als Marker für die strukturelle Integrität der Mitochondrien. Einzig die IFM des Herzens zeigten nach 20 Wochen kardialer Drucküberlastung eine Verminderung des CSR. Alle anderen Werte sind gegenüber der Kontrolle unverändert. Demnach wurde die Integrität der mitochondrialen Membran in den isolierten Mitochondrien des Herzmuskels durch eine kardiale Drucküberlastung nur gering beeinflusst. Im Skelettmuskel zeigte sich keine Veränderung in der mitochondrialen Integrität in den isolierten Mitochondrien.

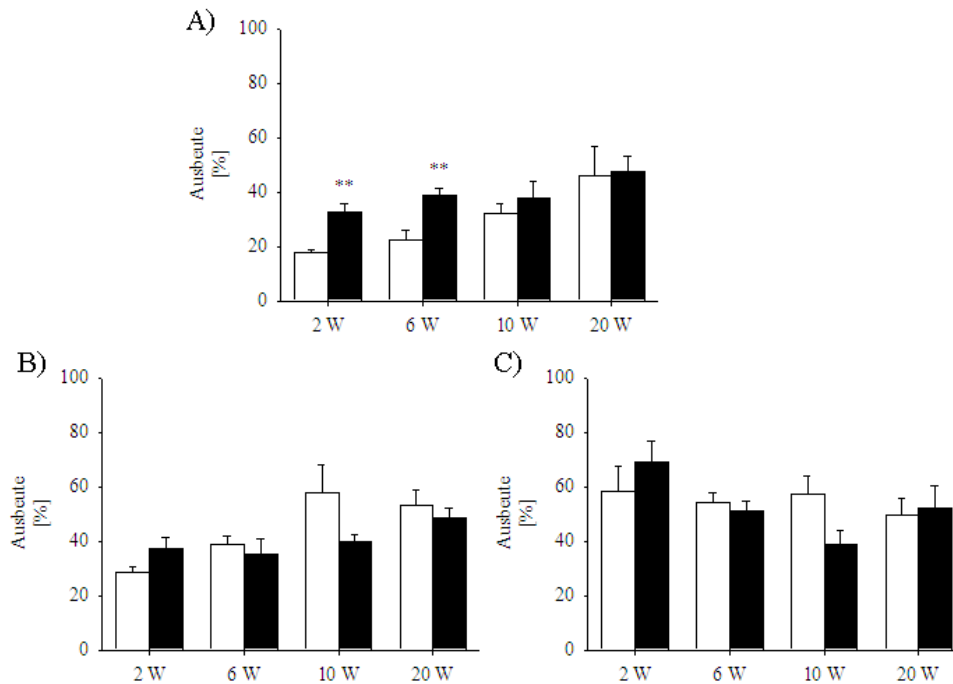


Abbildung 17: Mitochondriale Ausbeute des Herzens (A), des Gastrocnemius (B) und des Soleus (C) Muskels in Sham (weiße Balken) und TAC (schwarze Balken) Tieren nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung. Mittelwert \pm SEM; ** $p < 0,01$

Tabelle 12: Citratsynthase-Quotient isolierter Mitochondrien nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung

		Herz		Gastrocnemius		Soleus
		IFM	SSM	IFM	SSM	IFM/SSM
2 W	Sham	12,2 \pm 1,87	5,42 \pm 0,57	8,87 \pm 0,45	5,39 \pm 0,36	7,28 \pm 1,10
	TAC	9,88 \pm 1,19	5,89 \pm 0,82	10,3 \pm 0,97	5,45 \pm 0,51	9,51 \pm 0,89
6 W	Sham	10,7 \pm 2,47	7,05 \pm 1,18	10,9 \pm 1,39	6,03 \pm 0,48	5,98 \pm 1,17
	TAC	7,53 \pm 1,37	4,68 \pm 0,50	9,43 \pm 0,87	4,80 \pm 0,33 †	7,35 \pm 0,60
10 W	Sham	12,1 \pm 1,51	7,85 \pm 1,14	14,5 \pm 1,00	7,44 \pm 0,49	9,35 \pm 0,75
	TAC	13,2 \pm 0,75	9,13 \pm 0,73	16,3 \pm 0,85	7,85 \pm 0,39	11,7 \pm 1,04
20 W	Sham	12,9 \pm 0,75	8,61 \pm 0,73	13,8 \pm 0,59	6,84 \pm 0,42	10,9 \pm 0,90
	TAC	9,07 \pm 0,96 †	7,46 \pm 0,93	12,1 \pm 0,70	6,41 \pm 0,53	11,0 \pm 1,57

Mittelwert \pm SEM; † $p < 0,05$ vs. Sham

IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarkolemmale Mitochondrien; W - Wochen

3.4.5 Respiratorische Kapazität isolierter Mitochondrien

Die Bestimmung der respiratorischen Kapazität umfasst die Erfassung folgender Parameter:

maximale Atmung - State 3 Atmung (ADP stimuliert)

entkoppelte Atmung - DNP Atmung (DNP stimuliert)

basale Atmung - State 4 Atmung (ADP limitiert)

ADP/O Quotient

State 3 Atmung isolierter Mitochondrien

Die folgenden Abbildungen zeigen die maximale respiratorische Kapazität (State 3 Atmung) isolierter Mitochondrien des Herzens sowie der beiden Skelettmuskel. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurde die respiratorische Kapazität mit 4 Substraten untersucht (Glu - Glutamat; Pyr - Pyruvat/Malat; PC - Palmitoylcarnitin/Malat; Succ - Succinat).

Abbildung 18 zeigt die maximale respiratorische Kapazität isolierter interfibrillärer (linke Spalte) sowie subsarkolemmaler (rechte Spalte) Mitochondrien des Herzens. Zwei Wochen nach Induktion der Drucküberlastung zeigte sich eine deutliche Erhöhung der respiratorischen Kapazität in den interfibrillären Mitochondrien der TAC Tiere gegenüber den Sham Tieren. Diese signifikante Erhöhung zeigte sich mit allen vier Substraten. Im Gegensatz zu den IFM war in den subsarkolemmalen Mitochondrien des Herzens 2 Wochen nach Induktion der Aortenstenose nur ein leichter Anstieg der State 3 Atmung zu sehen. Erst nach 6 Wochen Drucküberlastung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der State 3 Atmung in den SSM. Dieser Anstieg war mit allen untersuchten Substraten zu sehen. In den IFM blieb die State 3 Atmung weiterhin erhöht. Nach 10 Wochen Drucküberlastung zeigte sich eine Normalisierung der State 3 Atmung in beiden Populationen. Lediglich mit dem Substrat Palmitoylcarnitin zeigte sich eine signifikante Verringerung der State 3 Atmung in den IFM im Vergleich zu den Sham Tieren. Mit dem Auftreten der kontraktilen Dysfunktion zeigte sich in beiden mitochondrialen Population des Herzen eine deutliche Reduktion der State 3 Atmung mit Komplex I Substraten. Die State 3 Atmung mit dem Komplex II Substrat Succinat blieb unverändert.

In Abbildung 19 ist die maximale respiratorische Kapazität der interfibrillären (linke Spalte) und subsarkolemmalen (rechte Spalte) Mitochondrien des Gastrocnemius

Muskels dargestellt. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt, 2 Wochen nach Induktion der Aortenstenose, waren keine Veränderungen in der respiratorischen Kapazität im Skelettmuskel zu finden. Nach 6 Wochen zeigte sich mit den Substraten Glutamat und Pyruvat eine signifikante Erhöhung der State 3 Atmung in den IFM und mit allen gemessenen Substraten eine signifikante Erhöhung der State 3 Atmung in den SSM. Nach 10 Wochen kardialer Drucküberlastung war die maximale respiratorische Kapazität in den IFM des Gastrocnemius signifikant erniedrigt, diese Tendenz setzte sich zum Zeitpunkt der kontraktiven Dysfunktion weiter fort. In den SSM normalisierte sich die State 3 Atmung nach 10 Wochen, lediglich mit dem Substrat Succinat war sie leicht erniedrigt. 20 Wochen nach Aortenstenose war die respiratorische Kapazität in den IFM um mehr als 50% reduziert. Dies zeigte sich sowohl mit den Komplex I Substraten Glutamat, Pyruvat und Palmitoylcarnitin, als auch mit dem Komplex II Substrat Succinat. In den SSM zeigte sich auch ein deutlicher Rückgang der respiratorischen Kapazität. Signifikant ausgeprägt war diese Erniedrigung mit den Substraten Glutamat und Palmitoylcarnitin. Etwas schwächer war die State 3 Atmung mit dem Substrat Pyruvat erniedrigt. Mit dem Substrat Succinat hingegen zeigte sich keine Beeinträchtigung der respiratorischen Kapazität.

Die Abbildung 20 zeigt die respiratorische Kapazität der Mitochondrien des Soleus Muskels. Im Gegensatz zum Gastrocnemius war in den Mitochondrien des Soleus bereits nach 2 Wochen kardialer Drucküberlastung eine deutliche Veränderung in der Atmungskapazität zu beobachten. Mit allen vier untersuchten Substraten zeichnete sich eine Zunahme der State 3 Atmung um mehr als das Dreifache ab. Auch zum Untersuchungszeitpunkt 6 Wochen blieb diese Erhöhung weiterhin bestehen, nahm mit den Substraten Glutamat, Pyruvat und Palmitoylcarnitin zudem noch deutlich zu. Nach 10 Wochen normalisierte sich das Verhältnis der Atmungskapazität zwischen Sham und TAC Tieren. Zum Zeitpunkt der kontraktiven Dysfunktion des Herzens nahm die maximale respiratorische Kapazität in den Mitochondrien des Soleus stark ab. Signifikant reduziert war dies mit den Substraten Glutamat sowie Palmitoylcarnitin, deutlich jedoch nicht signifikant mit dem Substrat Pyruvat. Mit dem Komplex II Substrat Succinat ließ sich keine Veränderung in der State 3 Atmung zwischen Sham und TAC Tieren feststellen.

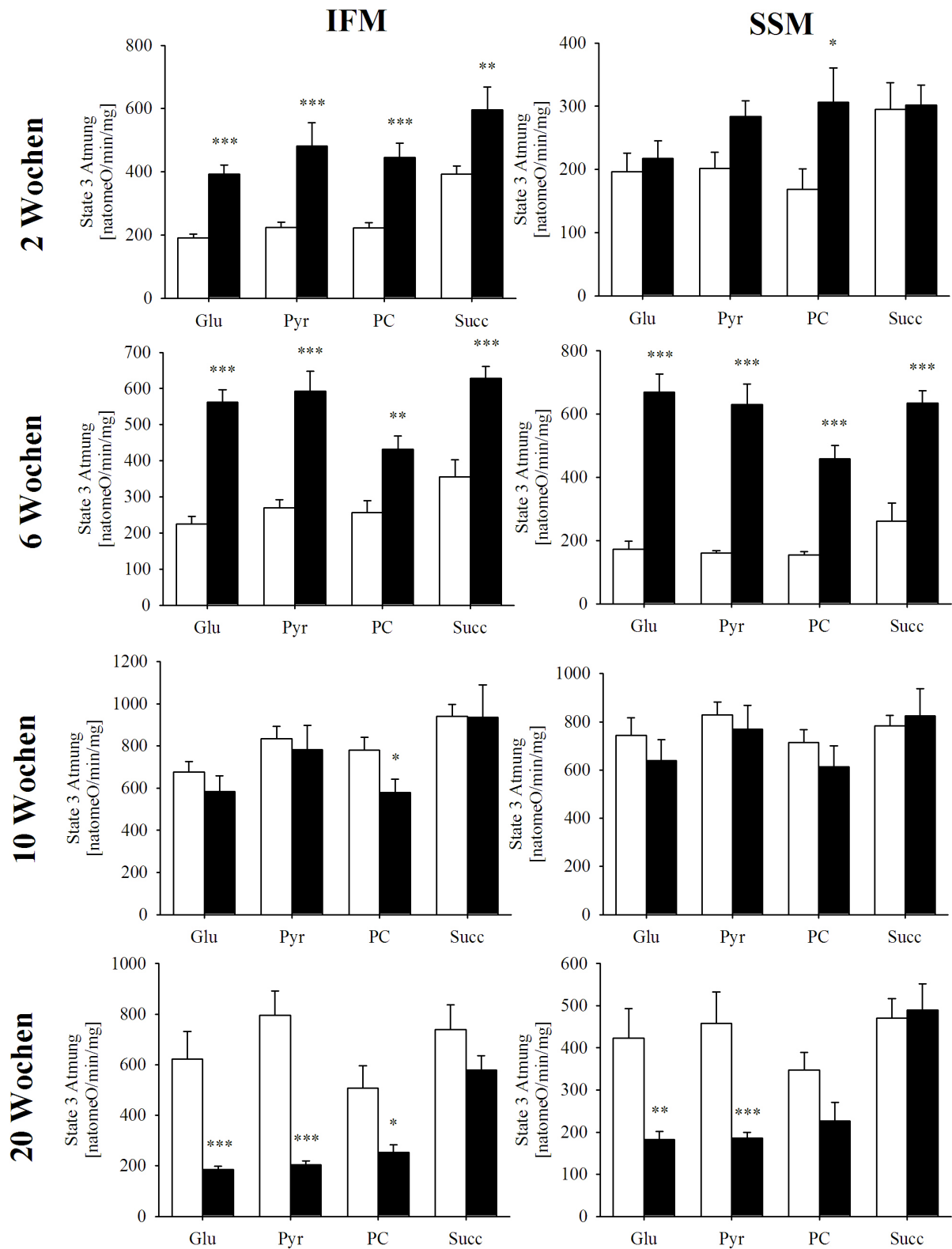


Abbildung 18: Maximale respiratorische Kapazität (State 3 Atmung) isolierter Mitochondrien des Herzens nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung (TAC - schwarze Balken) im Vergleich zu Kontrolltieren (Sham - weiße Balken). Die State 3 Atmung wurde durch die Gabe von ADP induziert, in Gegenwart von Glutamat (Glu), Pyruvat/Malat (Pyr), Palmitoylcarnitin/Malat (PC) und Succinat (Succ) als Substrat. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

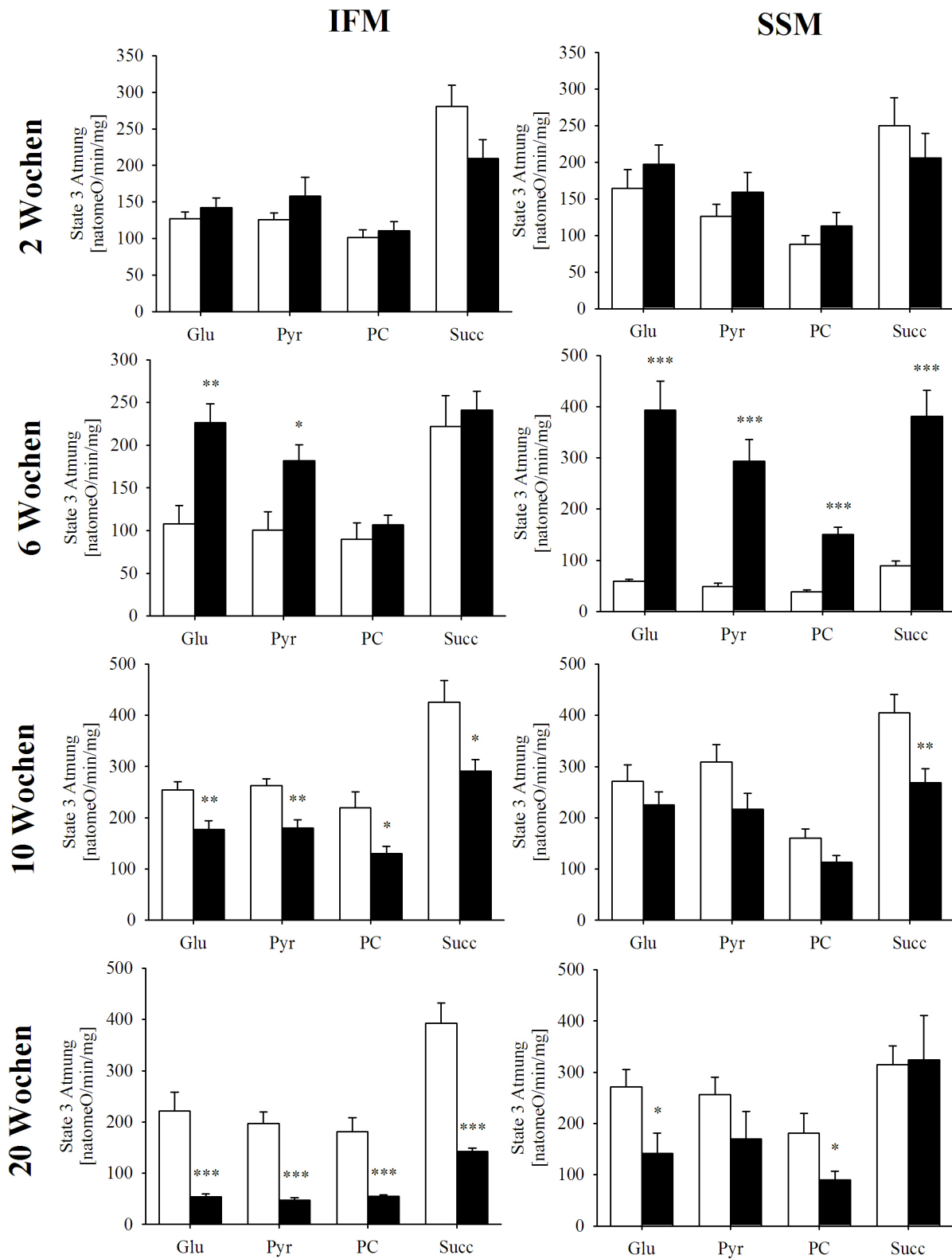


Abbildung 19: Maximale respiratorische Kapazität (State 3 Atmung) isolierter Mitochondrien des Gastrocnemius Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung (TAC - schwarze Balken) im Vergleich zu Kontrolltieren (Sham - weiße Balken). Die State 3 Atmung wurde durch die Gabe von ADP induziert, in Gegenwart von Glutamat (Glu), Pyruvat/Malat (Pyr), Palmitoylcarnitin/Malat (PC) und Succinat (Succ) als Substrat. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

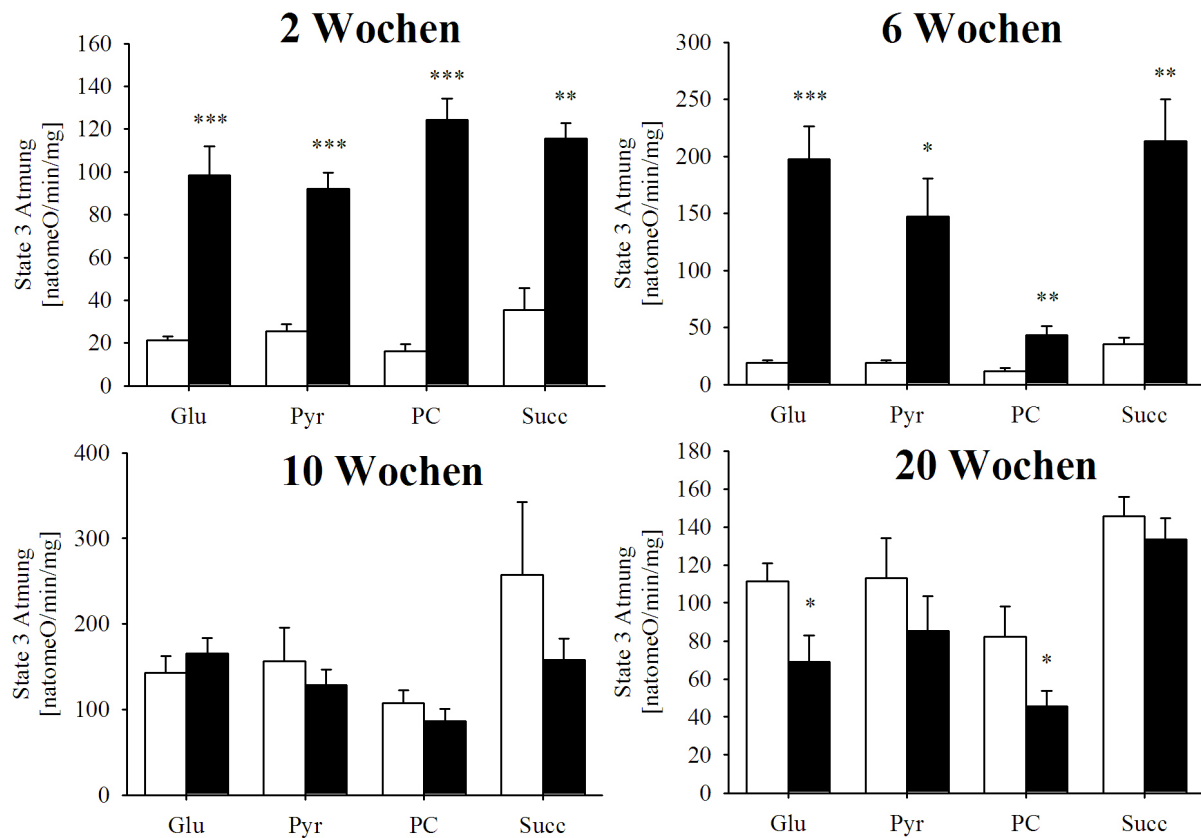


Abbildung 20: Maximale respiratorische Kapazität (State 3 Atmung) isolierter Mitochondrien des Soleus Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung (TAC - schwarze Balken) im Vergleich zu Kontrolltieren (Sham - weiße Balken). Die State 3 Atmung wurde durch die Gabe von ADP induziert, in Gegenwart von Glutamat (Glu), Pyruvat/Malat (Pyr), Palmitoylcarnitin/Malat (PC) und Succinat (Succ) als Substrat. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

State 3 Atmung entkoppelter Mitochondrien

In den Abbildungen 21 sowie 22 ist die entkoppelte Atmung unter Gabe von 2,4-Dinitrophenol (DNP) zu betrachten. Mittels des Entkopplers DNP wurde der Protonengradient an der Mitochondrienmembran zerstört und somit die Atmung unabhängig von der Funktion der ATP-Synthase und anderer Faktoren bestimmt. Abbildung 21 zeigt die entkoppelte Atmung mit dem Substrat Glutamat, Abbildung 22 mit dem Substrat Succinat. Somit wurden je ein Komplex I und ein Komplex II Substrat untersucht. Die entkoppelte Atmung mit DNP zeigte in allen untersuchten mitochondrialen Population einen ähnlichen Verlauf wie zuvor in der State 3 Atmung beschrieben wurde.

Die 1. Spalte der Abbildung 21 zeigt die entkoppelte Atmung der kardialen Mitochondrien (IFM, SSM) mit dem Substrat Glutamat. Auf einen initialen Anstieg folgte eine Normalisierung der Atmung zum Zeitpunkt 10 Wochen, danach fiel die DNP-Atmung im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab. Mit dem Substrat Succinat (Abb. 22) ergaben sich keine Veränderungen in der Atmungskapazität bei den IFM und lediglich ein leichter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zum 6 Wochen Zeitpunkt in den SSM.

Die Mitochondrien des Gastrocnemius zeigten mit Glutamat als Substrat einen initialen Anstieg zum Zeitpunkt 2 und 6 Wochen sowie eine deutliche Reduktion der Atmungskapazität nach 10 und 20 Wochen (Abb. 21). Mit dem Substrat Succinat war dieser initiale Anstieg auch in den SSM zu sehen, nicht jedoch in den IFM. Nach 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung zeigten die IFM des Gastrocnemius mit Succinat als Substrat eine deutliche Reduktion der Atmungskapazität. Die SSM waren im Vergleich zur Kontrolle nach 10 Wochen signifikant erniedrigt, nach 20 Wochen jedoch unverändert (Abb. 22).

In den Mitochondrien des Soleus Muskels lies sich der initiale Anstieg zum Zeitpunkt 2 und 6 Wochen ebenfalls deutlich mit beiden untersuchten Substraten verfolgen (Abb. 21, 22). Jedoch normalisierte sich die respiratorische Kapazität nach 10 und 20 Wochen wieder.

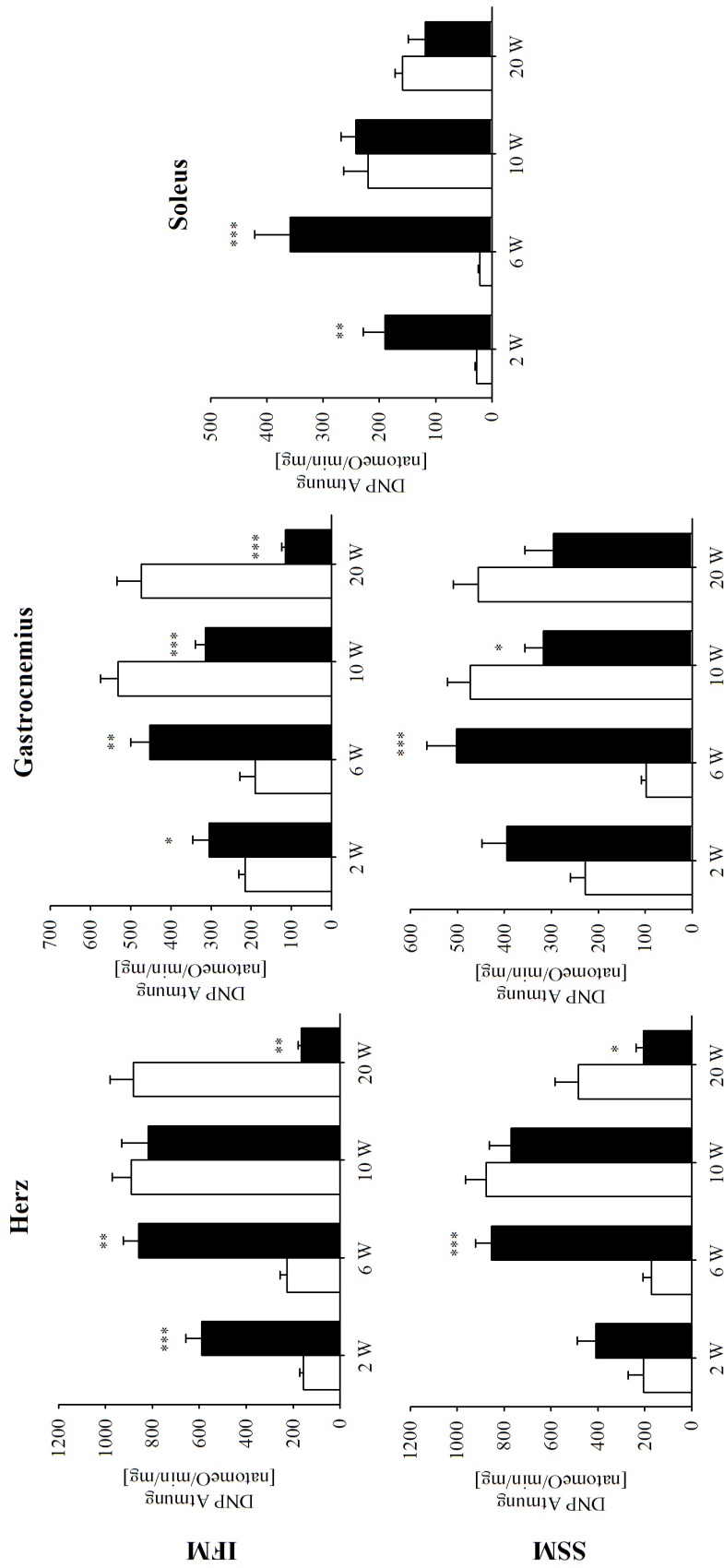


Abbildung 21: Entkoppelte Atmung isolierter Mitochondrien des Herzens (1.Spalte), des Gastrocnemius Muskels (2.Spalte) und des Soleus Muskels (3. Spalte) nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung (TAC - schwarze Balken) im Vergleich zu Kontrolltieren (Sham - weiße Balken) mit dem Substrat Glutamat. IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarkolemme Mitochondrien. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

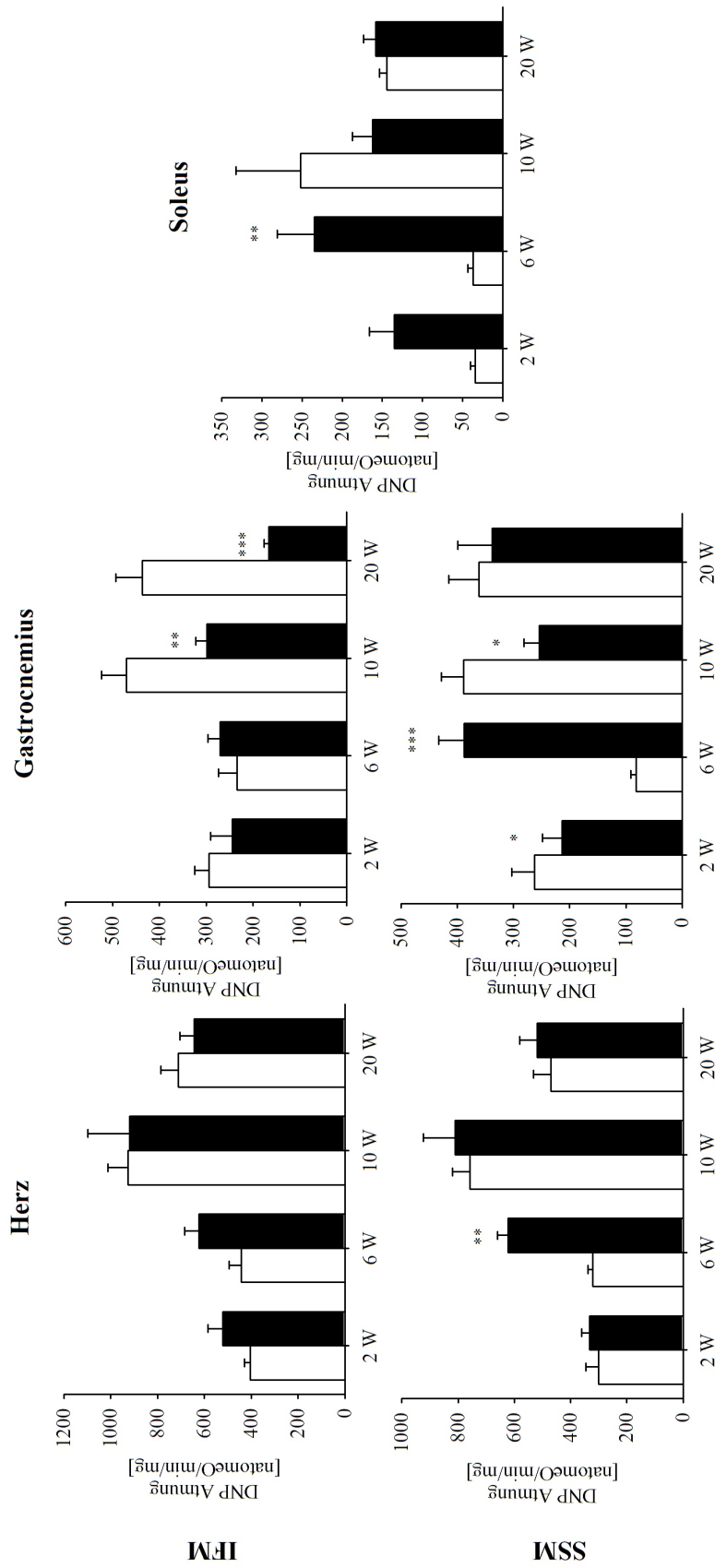


Abbildung 22: Entkoppelte Atmung isolierter Mitochondrien des Herzens (1.Spalte), des Gastrocnemius Muskels (2.Spalte) und des Soleus Muskels (3. Spalte) nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung (TAC - schwarze Balken) im Vergleich zu Kontrolltieren (Sham - weiße Balken) mit dem Substrat Succinat. IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarkolemale Mitochondrien. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

State 4 Atmung isolierter Mitochondrien

Tabelle 13 zeigt die State 4 Atmung der isolierten Mitochondrien der untersuchten Muskel. Die State 4 Atmung stellt die Phase der ADP-limitierten Atmung dar (siehe Abb. 8) und bezeichnet die nicht phosphorylierende Atmung.

In den Mitochondrien des Herzens zeigte sich eine leichte Reduktion der State 4 Atmung zu den untersuchten Zeitpunkten. In den IFM war diese Reduktion nach 6 Wochen mit dem Substrat Succinat, nach 10 Wochen mit Palmitoylcarnitin und nach 20 Wochen mit Glutamat signifikant ausgeprägt. In den SSM zeigte sich nach 10 Wochen eine signifikante Erniedrigung der State 4 Atmung mit den Substraten Glutamat und Palmitoylcarnitin.

Zwei Wochen Drucküberlastung führten in den IFM und den SSM des Gastrocnemius zu einer Reduktion der State 4 Atmung. Nach 6 Wochen Drucküberlastung zeigte sich in den IFM noch immer eine Erniedrigung, in den SSM des Gastrocnemius jedoch nun eine Erhöhung der State 4 Atmung. Nach 10 Wochen normalisierte sich die State 4 Atmung in beiden Populationen des Gastrocnemius. Lediglich mit Succinat als Substrat zeigte sich eine signifikante Erniedrigung. Nach 20 Wochen kardialer Drucküberlastung war die State 4 Atmung in den interfibrillären Mitochondrien des Gastrocnemius deutlich reduziert. In den SSM zeigte sich die State 4 Atmung unverändert bis leicht erniedrigt.

Die Mitochondrien des Soleus Muskels zeigten sowohl nach 2 als auch nach 6 Wochen kardialer Drucküberlastung eine erhöhte State 4 Atmung mit allen untersuchten Substraten. Zum Untersuchungszeitpunkt 10 Wochen zeigte sich eine Normalisierung der State 4 Atmung im Vergleich zur Kontrolle. Nach 20 Wochen war die State 4 Atmung in den Mitochondrien des Soleus leicht erniedrigt, signifikant jedoch nur mit dem Substrat Palmitoylcarnitin.

In Bezug auf die State 4 Atmung lässt sich kein einheitliches Bild darstellen. Die Mitochondrien des Herzens, des Gastrocnemius und des Soleus reagieren während der Phase der kompensierten kardialen Hypertrophie sehr unterschiedlich. Eine Erhöhung der State 4 Atmung deutet auf eine Entkopplung des Protonengradienten hin, welches durch die Öffnung von MPTP's oder eine erhöhte ATPase-Aktivität hervorgerufen werden kann.

Tabelle 13: State 4 Atmung isolierter Mitochondrien des Herzens, des Gastrocnemius Muskels und des Soleus Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung. Die State 4 Atmung wurde in Gegenwart von Glutamat, Pyruvat/Malat, Palmitoylearnitin/Malat und Succinat als Substrat bestimmt.

	2 Wochen				6 Wochen				10 Wochen				20 Wochen			
	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC
Herz	Glu	97,0 ± 7,79	84,5 ± 6,97		100 ± 13,1	90,6 ± 5,68		105 ± 6,83		85,9 ± 12,0		109 ± 15,3		76,5 ± 4,42 †		
	Pyr	122 ± 8,72	105 ± 6,27		113 ± 5,11	112 ± 6,15		125 ± 5,51		130 ± 23,4		133 ± 25,4		97,3 ± 7,64		
	PC	116 ± 6,84	95,2 ± 6,77		99,7 ± 9,95	103 ± 5,53		125 ± 7,70		91,9 ± 11,0 †		99,2 ± 9,35		104 ± 10,8		
	Succ	227 ± 11,2	228 ± 25,0		212 ± 25,3	310 ± 21,3 †		304 ± 15,9		245 ± 38,9		232 ± 22,0		249 ± 12,1		
Herz	Glu	148 ± 25,3	113 ± 16,0		138 ± 22,4	115 ± 5,39		175 ± 13,7		110 ± 13,0 †		135 ± 15,2		92,2 ± 12,8		
	Pyr	169 ± 21,1	115 ± 17,4		123 ± 7,72	120 ± 6,51		172 ± 12,4		133 ± 21,8		131 ± 16,9		105 ± 10,6		
	PC	127 ± 22,0	130 ± 19,4		107 ± 11,1	119 ± 7,34		168 ± 12,0		114 ± 15,4 †		119 ± 23,4		118 ± 16,5		
	Succ	262 ± 33,4	180 ± 7,99		226 ± 47,5	285 ± 15,5		334 ± 28,3		241 ± 31,1		209 ± 35,9		236 ± 24,2		
Gastro	Glu	65,3 ± 8,72	34,2 ± 6,44 †		72,0 ± 14,9	33,1 ± 3,07 †		52,7 ± 6,48		41,7 ± 4,38		46,4 ± 6,69		29,4 ± 4,31		
	Pyr	72,9 ± 7,96	34,9 ± 6,35 †		62,2 ± 12,3	37,9 ± 3,12 †		56,4 ± 6,55		41,2 ± 4,31		39,8 ± 2,82		27,3 ± 3,14 †		
	PC	63,2 ± 7,55	32,6 ± 4,27 †		66,3 ± 15,1	30,1 ± 2,72 †		61,3 ± 7,63		46,0 ± 5,18		56,6 ± 7,48		33,9 ± 1,35 †		
	Succ	163 ± 16,0	87,6 ± 10,2 †		130 ± 23,7	85,9 ± 10,0		135 ± 15,1		91,7 ± 8,50 †		125 ± 16,0		70,5 ± 6,94 †		
Gastro	Glu	107 ± 16,6	92,9 ± 12,2		52,3 ± 2,95	119 ± 18,4 †		92,7 ± 11,2		83,0 ± 9,93		118 ± 22,7		82,9 ± 12,1		
	Pyr	100 ± 9,33	68,8 ± 6,67 †		44,8 ± 5,65	119 ± 19,0 †		95,9 ± 13,3		82,9 ± 10,3		102 ± 22,0		98,2 ± 18,7		
	PC	64,7 ± 7,25	66,3 ± 12,0		34,2 ± 4,04	91,5 ± 13,6 †		102 ± 17,9		70,6 ± 7,80		112 ± 29,8		69,9 ± 14,2		
	Succ	179 ± 21,6	120 ± 11,9 †		76,6 ± 8,43	196 ± 27,3 †		177 ± 17,1		127 ± 12,5 †		139 ± 19,1		182 ± 42,6		
Soleus	Glu	15,7 ± 1,41	20,8 ± 1,85 †		14,5 ± 1,60	32,4 ± 6,00 †		42,8 ± 4,61		50,3 ± 7,56		32,7 ± 3,41		25,3 ± 2,84		
	Pyr	18,9 ± 2,06	39,3 ± 3,19 †		16,4 ± 1,79	36,5 ± 8,79		56,0 ± 9,87		44,5 ± 5,88		44,5 ± 9,26		31,3 ± 4,21		
	PC	10,2 ± 1,33	36,3 ± 8,58 †		9,45 ± 2,06	32,1 ± 6,56 †		65,1 ± 15,1		45,2 ± 7,96		35,2 ± 3,17		24,2 ± 1,57 †		
	Succ	28,6 ± 5,91	58,9 ± 8,65 †		28,6 ± 4,74	88,3 ± 18,2 †		120 ± 35,3		69,8 ± 11,4		64,8 ± 2,48		61,8 ± 6,17		

Mittelwert ± SEM; † p < 0,05; ‡ p < 0,001

Gastro - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarkolemmale Mitochondrien; Glu - Glutamat; Pyr - Pyruvat/Malat; PC - Palmitoylearnitin/Malat; Succ - Succinat

ADP/O Quotient isolierter Mitochondrien

Tabelle 14 zeigt den ADP/O oder auch P/O Quotienten der isolierten Mitochondrien. Dieser Quotient gibt das Verhältnis zwischen ATP-Synthese und Sauerstoff-Verbrauch wieder und ist ein Marker für die Effizienz der Atmungskette. Sowohl in den Mitochondrien des Herzens als auch in den Mitochondrien des Skelettmuskels war der ADP/O Quotient zu keinem untersuchten Zeitpunkt und mit keinem verwendeten Substrat erniedrigt. Oftmals zeigte sich sogar eine leichte Erhöhung des ADP/O Quotienten, dies würde auf für eine bessere Kopplung zwischen Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion hinweisen.

Eine Erniedrigung bzw. Erhöhung der State 4 Atmung sowie eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des ADP/O Quotienten gehen oftmals gemeinsam einher und sprechen für eine verbesserte Kopplung bzw. Entkopplung innerhalb der Mitochondrien.

3.4.6 Aktivität der Atmungskettenkomplexe in isolierten Mitochondrien

Die Aktivität der individuellen Atmungskettenkomplexe wurde in isolierten Mitochondrien, in denen die mitochondriale Membran durch einfrieren bei -80°C aufgebrochen wurde, photometrisch bestimmt. In den folgenden Abbildungen sind die relativen Aktivitäten der Komplexe dargestellt. Um die relative Aktivität eines jeden Komplexes zu ermitteln, wurden die Absolutwerte auf die jeweilige Kontrolle normiert, welche im Diagramm mit einer waagerechten Linie symbolisiert ist. Dies soll der besseren Übersicht dienen. Die Absolutwerte sind tabellarisch im Anhang aufgelistet.

Abbildung 23 A) zeigt die relative Aktivität der Atmungskettenkomplexe in den interfibrillären Mitochondrien des Herzens. Zu den Untersuchungszeitpunkten 2 und 6 Wochen zeigten sich keine Veränderungen in der Aktivität der Komplexe. Erst nach 10 Wochen kardialer Drucküberlastung zeigte sich eine Reduktion der Komplex I Aktivität. Diese Reduktion blieb bis in die kontraktile Dysfunktion bestehen. Die Aktivität der anderen Atmungskettenkomplexe blieb weiterhin unverändert.

Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Aktivität der Komplexe in den subsarkolemmalen Mitochondrien des Herzens 23 B). Lediglich die Aktivität von Komplex I zeigte eine signifikante Reduktion nach 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung. Eine leichte Reduktion der Aktivität der Komplexe III und IV lies sich zum Zeitpunkt 20 Wochen feststellen. Die Aktivität des verbleibenden Komplex II zeigte sich weitgehend unverändert.

Abbildung 24 A) zeigt die relativen Komplexaktivitäten der interfibrillären Mitochondrien des Gastrocnemius. Zwei Wochen Drucküberlastung führten zu einem Anstieg der Enzymaktivitäten an Komplex I und II. Nach 6 Wochen sank die Aktivität von Komplex I auf einen normalen Wert, die Aktivität des Komplexes II blieb weiterhin erhöht. 10 Wochen kardiale Drucküberlastung führten zu einer Erniedrigung der Komplexaktivitäten, signifikant an Komplex I. Mit Auftreten der systolischen Dysfunktion des Herzens, zeigten die interfibrillären Mitochondrien des Gastrocnemius eine signifikante Reduktion der Aktivität der Komplexe I, II und III um mehr als 50%. Auch die Aktivität von Komplex IV war erniedrigt.

Abbildung 24 B) zeigt die relativen Komplexaktivitäten der subsarkolemmalen Mitochondrien des Gastrocnemius. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den IFM. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt war die Enzymaktivität der Komplexe I und II im Vergleich zur Kontrolle stark erhöht. Nach 6 Wochen kardialer Drucküberlastung zeigte sich zusätzlich eine Erhöhung der Enzymaktivität von Komplex III. Zum Untersuchungszeitpunkt 10 Wochen normalisierte sich die Enzymaktivität von Komplex I. Die Aktivität der Komplexe II und III war im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Mit Auftreten der systolischen Dysfunktion war die Enzymaktivität aller vier Komplexe signifikant reduziert.

Abbildung 25 zeigt die relativen Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe in den Mitochondrien des Soleus Muskels. 2 Wochen nach der kardialen Drucküberlastung war die Enzymaktivität der Komplexe I und II stark erhöht, wohingegen die Aktivität der Komplexe III und IV normal, bis leicht erniedrigt schien. Nach 6 und 10 Wochen kardialer Drucküberlastung war die Enzymaktivität der vier Atmungskettenkomplexe wieder normalisiert. Mit Auftreten der systolischen Dysfunktion zeigte sich in den Mitochondrien des Soleus eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität der Komplexe I, II und IV. Die Aktivität von Komplex III war nur schwach erniedrigt.

Im Anhang befinden sich in Tabelle 15 - 18 die Absolutwerte der Enzymaktivitäten. Anhand dieser Absolutwerte kann man die unterschiedlichen Aktivitäten bzw. Geschwindigkeiten der Komplexe vergleichen. Komplex II scheint hinsichtlich der Aktivität der langsamste Komplex der Atmungskette zu sein, gefolgt von Komplex I. Eine deutlich höhere Aktivität zeigen die Komplexe III und IV, sie haben eine 100fach höhere Aktivität als die beiden Komplexe I und II.

Tabelle 14: ADP/O Quotient isolierter Mitochondrien des Herzens, des Gastrocnemius Muskels und des Soleus Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung. Die ADP/O Quotient wurde in Gegenwart von Glutamat, Pyruvat/Malat, Palmitoylearnitin/Malat und Succinat als Substrat bestimmt.

		2 Wochen		6 Wochen		10 Wochen		20 Wochen	
		Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC
Herz	Glu	2,41 ± 0,15	2,96 ± 0,29	2,18 ± 0,08	2,48 ± 0,03 †	1,85 ± 0,16	2,32 ± 0,19	2,07 ± 0,31	2,31 ± 0,14
	Pyr	2,09 ± 0,14	2,94 ± 0,35 †	2,41 ± 0,21	2,68 ± 0,14	2,02 ± 0,15	2,56 ± 0,22	2,42 ± 0,36	2,45 ± 0,11
	PC	2,34 ± 0,09	3,01 ± 0,34 †	1,96 ± 0,18	2,91 ± 0,06 †	1,82 ± 0,16	2,51 ± 0,15 †	2,38 ± 0,09	1,95 ± 0,21
	Succ	1,21 ± 0,08	1,68 ± 0,26 †	1,66 ± 0,40	1,67 ± 0,16	0,99 ± 0,10	1,35 ± 0,12 †	1,38 ± 0,05	1,39 ± 0,22
Herz	Glu	2,10 ± 0,20	2,36 ± 0,35	1,91 ± 0,14	2,25 ± 0,12	1,75 ± 0,13	2,28 ± 0,21	1,98 ± 0,29	2,53 ± 0,07 †
	Pyr	2,33 ± 0,50	2,80 ± 0,28	2,34 ± 0,33	2,81 ± 0,06	1,98 ± 0,15	2,43 ± 0,22	2,01 ± 0,31	2,57 ± 0,12
	PC	3,07 ± 0,48	2,61 ± 0,23	1,99 ± 0,19	2,68 ± 0,19 †	1,81 ± 0,18	2,34 ± 0,19	2,23 ± 0,15	2,26 ± 0,33
	Succ	0,92 ± 0,10	1,58 ± 0,18 †	2,54 ± 0,46	1,47 ± 0,07 †	0,92 ± 0,08	1,48 ± 0,22 †	1,20 ± 0,09	1,18 ± 0,06
Gastro	Glu	2,63 ± 0,10	2,82 ± 0,28	2,56 ± 0,17	2,51 ± 0,03	1,86 ± 0,16	2,26 ± 0,14	1,94 ± 0,18	2,49 ± 0,27
	Pyr	2,36 ± 0,08	2,95 ± 0,34 †	2,76 ± 0,27	2,71 ± 0,07	1,95 ± 0,16	2,34 ± 0,16	2,21 ± 0,15	2,54 ± 0,10
	PC	3,26 ± 0,33	2,86 ± 0,25	3,01 ± 0,20	2,87 ± 0,08	1,76 ± 0,22	2,13 ± 0,12	1,78 ± 0,22	2,78 ± 0,40 †
	Succ	1,06 ± 0,05	1,76 ± 0,27 †	1,12 ± 0,03	2,15 ± 0,25 †	1,01 ± 0,12	1,38 ± 0,09 †	1,14 ± 0,11	1,20 ± 0,09
Gastro	Glu	3,03 ± 0,68	2,34 ± 0,31	1,92 ± 0,16	1,99 ± 0,12	1,65 ± 0,13	1,78 ± 0,17	1,61 ± 0,18	2,95 ± 0,40 †
	Pyr	2,49 ± 0,52	2,44 ± 0,19	2,82 ± 0,44	2,09 ± 0,18	1,78 ± 0,13	1,81 ± 0,18	2,29 ± 0,59	2,57 ± 0,23
	PC	3,65 ± 0,47	2,58 ± 0,24	2,66 ± 0,53	2,14 ± 0,19	1,36 ± 0,16	1,52 ± 0,21	1,71 ± 0,35	4,15 ± 0,71 †
	Succ	0,99 ± 0,13	1,50 ± 0,15 †	1,24 ± 0,20	1,28 ± 0,12	0,85 ± 0,10	1,04 ± 0,08	1,06 ± 0,13	1,15 ± 0,13
Soleus	Glu	2,38 ± 0,30	2,71 ± 0,28	2,32 ± 0,28	2,46 ± 0,06	1,90 ± 0,37	1,95 ± 0,17	1,77 ± 0,14	2,51 ± 0,37
	Pyr	1,55 ± 0,18	2,63 ± 0,26 †	2,81 ± 0,61	2,58 ± 0,05	1,53 ± 0,11	2,05 ± 0,28	1,64 ± 0,19	2,31 ± 0,21 †
	PC	3,77 ± 0,87	2,88 ± 0,47	4,01 ± 1,08	3,63 ± 0,65	2,63 ± 0,65	3,19 ± 0,80	2,35 ± 1,16	4,22 ± 1,17
	Succ	1,08 ± 0,11	1,83 ± 0,41	1,65 ± 0,49	1,65 ± 0,10	0,81 ± 0,20	0,98 ± 0,23	0,89 ± 0,13	1,08 ± 0,18

Mittelwert ± SEM; † p < 0,05; ‡ p < 0,001

Gastro - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarkolemmale Mitochondrien; Glu - Glutamat;

Pyr - Pyruvat/Malat; PC - Palmitoylearnitin/Malat; Succ - Succinat

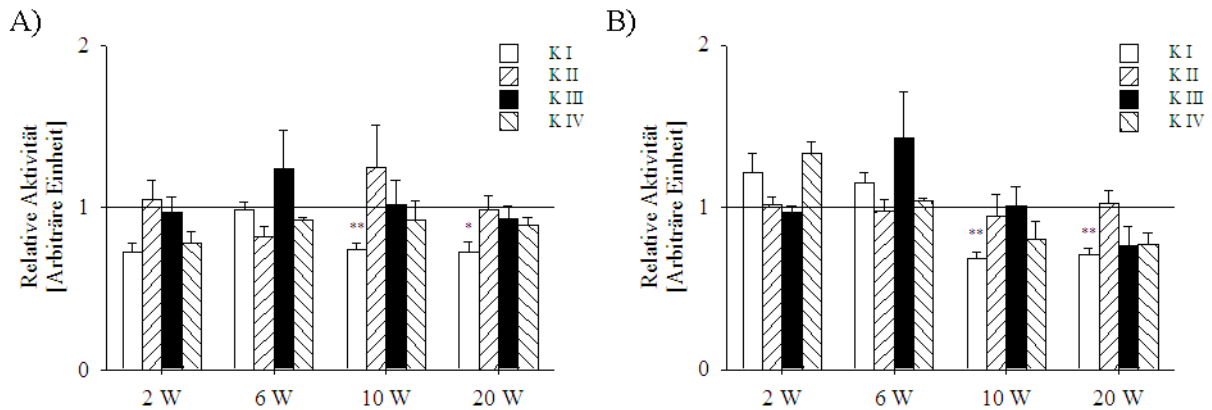


Abbildung 23: Relative Aktivität der individuellen Atmungskettenkomplexe in isolierten interfibrillären (A) und subsarkolemmalen (B) Mitochondrien des Herzens nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

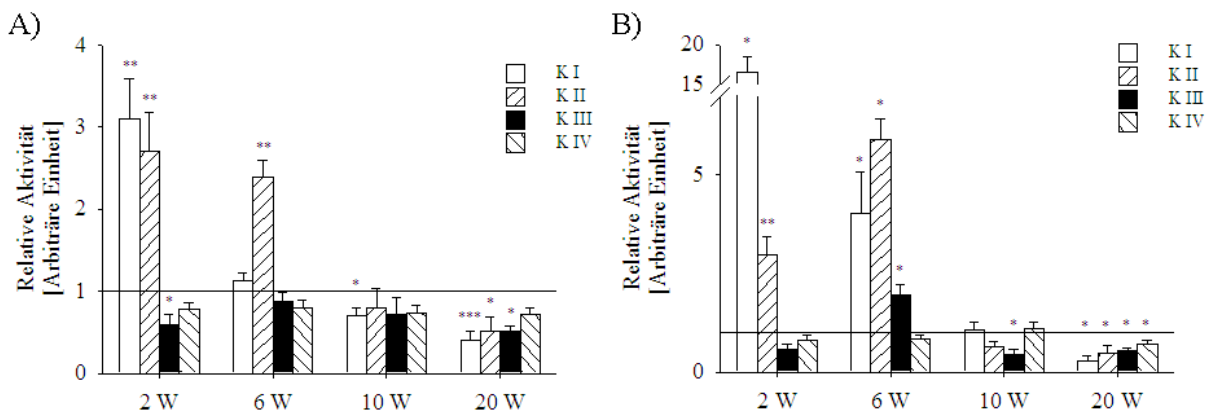


Abbildung 24: Relative Aktivität der individuellen Atmungskettenkomplexe in isolierten interfibrillären (A) und subsarkolemmalen (B) Mitochondrien des Gastrocnemius Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.5 Gen- und Proteinexpression der Atmungskette

Die Aktivität der individuellen Atmungskettenkomplexe ist zu verschiedenen Zeitpunkten erhöht bzw. erniedrigt. Dies könnte auf eine veränderte Gen- bzw. Proteinexpression zurückzuführen sein. Um dies zu klären, wurden im Folgenden die mRNA-Expression und die Proteinexpression einzelner Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe untersucht.

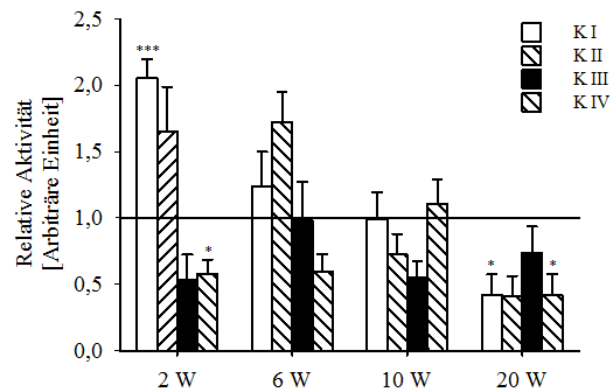


Abbildung 25: Relative Aktivität der individuellen Atmungskettenkomplexe in isolierten Mitochondrien des Soleus Muskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.5.1 mRNA Expression

Die Abbildung 26 zeigt die relative mRNA-Expression einzelner Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe im Herzen und im Skelettmuskel. Da die mRNA-Expression von S29 durch eine kardiale Drucküberlastung nicht beeinflusst wurde, konnte es als Kontrollgen verwendet werden.

Die individuellen Komplexe sind aus vielen Untereinheiten zusammengesetzt, pro Komplex wurde ein nukleär kodiertes Gen untersucht.

- Komplex I - *NDUFA10* - NADH Dehydrogenase 1 alpha Subkomplex Untereinheit 10
- Komplex II - *SdhB* - Succinat Dehydrogenase Untereinheit B - Eisen-Schwefel-Protein
- Komplex III - *UQCRC2* - Ubiquinol Cytochrom c Reduktase Kernprotein 2
- Komplex IV - *CoxIV* - Cytochrom c Oxidase Untereinheit IV
- Komplex V - *ATP5A1* - ATP Synthase, H^+ transportierend, mitochondrialer F1 Komplex, alpha 1

Die Genexpression wurde auf die Kontrolle (Sham) normiert, welche im Diagramm als waagerechte Linie (=1) dargestellt ist.

Abbildung 26 A) zeigt die mRNA-Expression einzelner Untereinheiten im Herzmuskel.

Die Expression der gewählten Untereinheiten war zu fast jedem Untersuchungszeitpunkt leicht erniedrigt. Zum Zeitpunkt 2 Wochen äußerte sich dies signifikant in der erniedrigten Expression der Komplex V Untereinheit. Nach 6 Wochen kardialer Drucküberlastung zeigten die Untereinheiten der Komplexe I, III und V eine signifikante Erniedrigung. Alle 5 detektierten Untereinheiten waren nach 10 Wochen signifikant erniedrigt. Zum Zeitpunkt der kardialen Dysfunktion war die Expression der Komplex I, II und V Untereinheiten signifikant erniedrigt, die Expression der Untereinheiten III und IV jedoch völlig unverändert im Vergleich zur Kontrolle.

Abbildung 26 B) zeigt die mRNA-Expression einzelner Atmungskettenkomplexuntereinheiten im Gastrocnemius Muskel. Die mRNA-Expression der Komplex I und III Untereinheiten war zu allen untersuchten Zeitpunkten normal. Die Expression der Komplex II Untereinheit war nach 20 Wochen kardialer Drucküberlastung verringert. Die Expression der Komplex IV Untereinheit war nach 2 Wochen unverändert, nach 6 und 10 Wochen signifikant erniedrigt, nach 20 Wochen jedoch stark erhöht. Die Expression der ATPase Untereinheit war nach 6 und 10 Wochen erniedrigt, nach 20 Wochen jedoch wieder normal.

In Abbildung 26 C) ist die mRNA-Expression im Soleus Muskel dargestellt. Die mRNA-Expression der Komplex I und V Untereinheiten war zu jedem untersuchten Zeitpunkt unverändert. Komplex II zeigte nach 6 Wochen kardialer Drucküberlastung eine leichte Erhöhung der Expression. Die Expression der Komplex III Untereinheit war nach 20 Wochen signifikant erniedrigt. Die Komplex IV Untereinheit zeigte nach 2 Wochen Drucküberlastung eine leichte Erniedrigung in der Expression, welche sich im weiteren Verlauf wieder normalisierte. Auffällig war auch beim Soleus Muskel die stark erhöhte Expression der Komplex IV Untereinheit nach 20 Wochen.

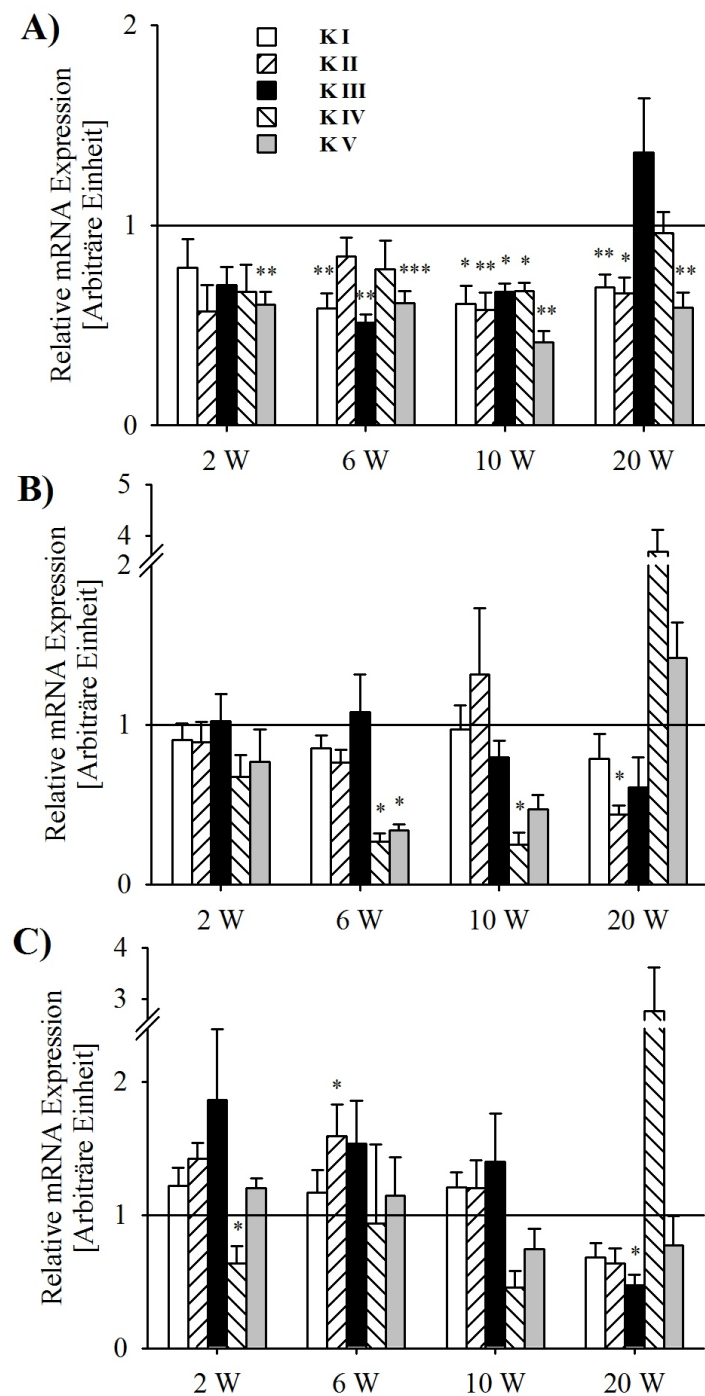


Abbildung 26: Relative mRNA Expression einzelner Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette im Herzen A), im Gastrocnemius B) und im Soleus C) nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) Drucküberlastung. Als Kontrollgen wurde S29 verwendet und alle Genexpressionen darauf bezogen. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.5.2 ANT Expression

Die Adeninnukleotid-Translokase ist ein mitochondriales Protein, welches den Austausch zwischen ADP und ATP zwischen dem Cytoplasma und der mitochondrialen Matrix ermöglicht. Abbildung 27 zeigt die mRNA Expression des ANT1 Genes im Herzen und im Skelettmuskel zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten.

Im Herzen ist die mRNA Expression zu allen untersuchten Zeitpunkten erniedrigt. Hingegen zeigt sich im Skelettmuskel ein Wechsel von Erniedrigung und Erhöhung der mRNA Expression. Im Gastrocnemius ist die Expression nach 10 Wochen leicht erhöht, nach 6 und 20 Wochen signifikant erniedrigt. Im Soleus Muskel hingegen ist die Expression nach 6 Wochen stark erhöht, nach 10 und 20 Wochen jedoch erniedrigt.

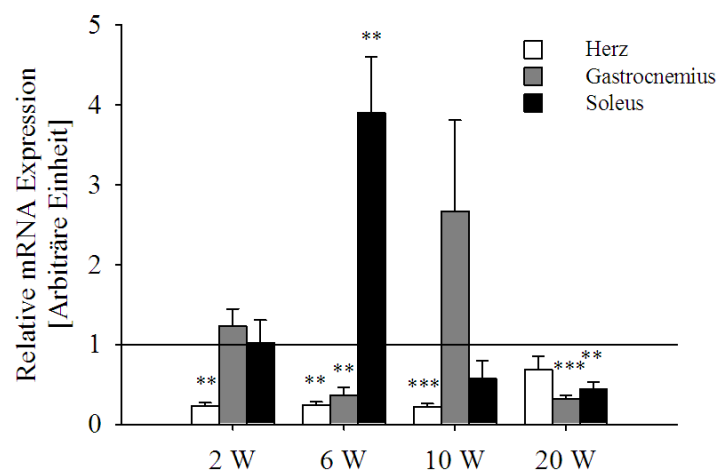


Abbildung 27: Relative mRNA-Expression des ANT1 Genes im Herz- und Skelettmuskel. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.5.3 Proteinexpression

In der Abbildung 28 ist die relative Proteinexpression einzelner Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette im Herz- und Skelettmuskel abgebildet. Mit Hilfe des verwendeten Antikörpers wurde je Atmungskettenkomplex eine Untereinheit detektiert.

- Komplex I - NDUFB8 - NADH Dehydrogenase 1 beta Subkomplex Untereinheit 8
- Komplex II - SdhB - Succinat Dehydrogenase Untereinheit B - Eisen-Schwefel-Protein

- Komplex III - UQCR2/QCR2 - Ubiquinol Cytochrome c Reduktase Kern Protein 2
- Komplex IV - CIV-I - Untereinheit 1
- Komplex V - CV - ATPase-Untereinheit alpha

Die Proteinexpression der Untereinheiten wurde auf die Kontrolle (Sham) normiert, welche im Diagramm als waagerechte Linie (=1) dargestellt ist.

Die Proteinexpression einzelner Untereinheiten im Herzmuskel ist in Abbildung 28 A) dargestellt. Die Expression der Komplex I Untereinheit ist zu den untersuchten Zeitpunkten 10 und 20 Wochen um das Doppelte erhöht. Die restlichen untersuchten Untereinheiten zeigten nach 10 Wochen kardialer Drucküberlastung eine leichte Reduktion in der Expression. Dies äußerte sich signifikant bei den Untereinheiten der Komplexe III und V. Nach 20 Wochen zeigte sich keine Erniedrigung der Proteinexpression der untersuchten Untereinheiten. Die Untereinheit von Komplex IV wies hingegen eine signifikante Erhöhung der Expression auf.

Abbildung 28 B) zeigt die Proteinexpression einzelner Komplexuntereinheiten im Gastrocnemius Muskel. Nach 2 Wochen kardialer Drucküberlastung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression der Komplex III Untereinheit sowie nach 6 Wochen eine signifikante Erhöhung der Expression der Komplex I, II und III Untereinheiten. Nach 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung war die Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Nur die Untereinheit des Komplex III zeigte nach 20 Wochen eine leichte, dennoch signifikante Erniedrigung. Abbildung 28 C) zeigt die Proteinexpression einzelner Komplexuntereinheiten im Soleus Muskel. Hier zeigten sich wenig Veränderungen in Bezug auf die Proteinexpression der einzelnen Untereinheiten. Die Untereinheit des Komplex I zeigte nach 2 Wochen eine leichte Erhöhung und nach 20 Wochen eine Erniedrigung in der Proteinexpression. Nach 6 Wochen Drucküberlastung zeigte auch Komplex III eine leichte Erhöhung der Proteinexpression.

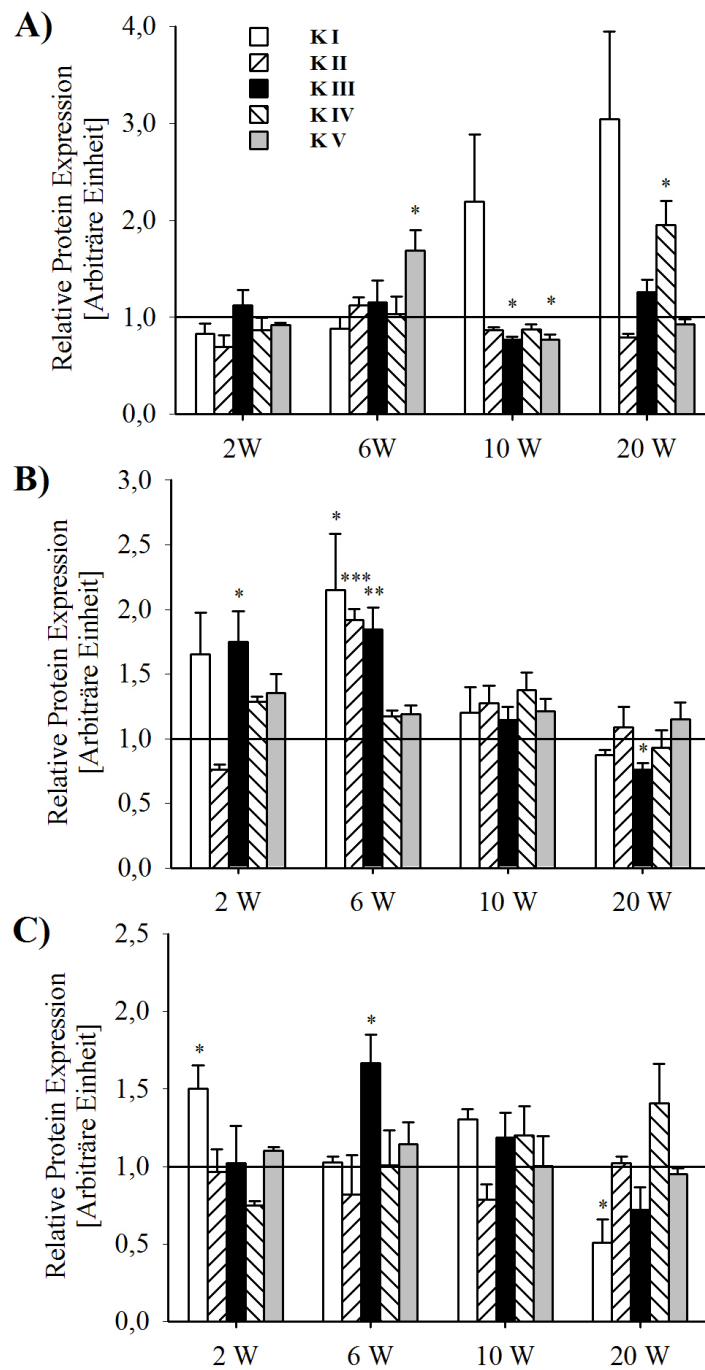


Abbildung 28: Relative Proteinexpression verschiedener Untereinheiten der individuellen Elektronentransportkettenkomplexe im Herz A), im Gastrocnemius B) und im Soleus C) nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.5.4 Respirasomen

Die geringen Veränderungen in der mRNA- bzw. Proteinexpression können die gravierenden Veränderungen in der Komplexaktivität nicht erklären. Laut Rosca et al. (Rosca et al. 2008) kann eine Störung in der Bildung der Respirasomen zu einer Einschränkung in der respiratorischen Kapazität führen. Aus diesem Grund wurde die Menge an Respirasomen, zum Zeitpunkt der größten funktionellen Einschränkung, mittels einer nativen Gelelektrophorese im Herz- und Skelettmuskel bestimmt.

Abbildung 29 zeigt eine repräsentative Aufnahme eines 1D blau-nativen Gels. Gut zu erkennen ist die Auftrennung der einzelnen Atmungskettenkomplexe sowie die respiratorischen Superkomplexe.

In Abbildung 30 A) ist die relative Intensität der Bande grafisch dargestellt, welche den Atmungskettenkomplex V repräsentiert. Die Intensität der Bande war weder im Herzmuskel, noch im Skelettmuskel unterschiedlich zur Kontrolle und kann daher als Bezugsbande verwandt werden. Die Intensität der Bande, welche den respiratorischen Superkomplex $CICIII_2CIV$ repräsentiert, ist in Abbildung 30 B) dargestellt. Die Intensität der respiratorischen Superkomplexbande wurde auf die Intensität der Komplex V Bande bezogen, wie von Rosca et al. (Rosca et al. 2008) beschrieben. Die Abbildung verdeutlicht, dass es keine Unterschiede in der Menge an respiratorischen Superkomplex $CICIII_2CIV$ weder im Herzmuskel, noch im Skelettmuskel gab.

Untersucht wurden ebenfalls die beiden anderen respiratorischen Superkomplexe (0, 2). Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen Sham und TAC Tieren. Die Untersuchung der respiratorischen Superkomplexe wurde nur zum Zeitpunkt 20 Wochen durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die mitochondriale Funktion am stärksten eingeschränkt war.

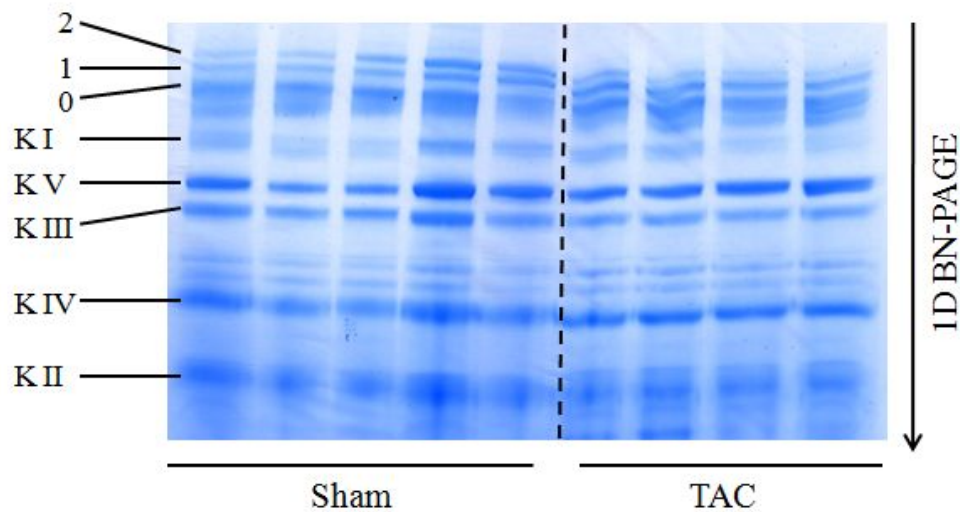


Abbildung 29: Repräsentative Aufnahme der Auftrennung des supramolekularen Assembly der Atmungskettenkomplexe durch eine eindimensionale native Gelelektrophorese (BN-PAGE) in isolierten Mitochondrien von Sham- und TAC-Tieren. Die individuellen Atmungskettenkomplexe sind mit der Bezeichnung KI bis KV gekennzeichnet. Die Banden 0 bis 2 repräsentieren die respiratorischen Superkomplexe, bestehend aus monomeren Komplex I, dimeren Komplex III und null (0), ein (1) oder zwei (2) Kopien von Komplex IV. Bande 2 stellt den wichtigsten und am häufigsten vorkommenden respiratorischen Superkomplex $CICIII_2CIV$ dar.

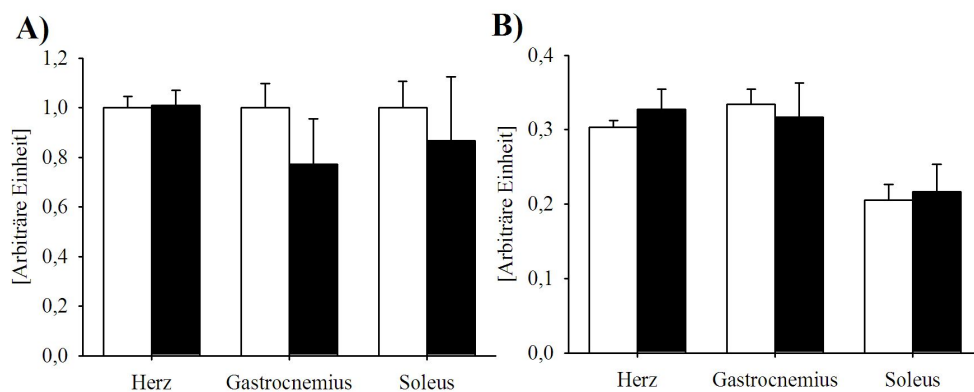


Abbildung 30: 1D-BN-PAGE von Mitochondrien des Herz- und Skelettmuskels nach 20 Wochen kardialer Drucküberlastung. Dargestellt ist die Stärke der Bande welche Komplex V repräsentiert (A) und die Stärke der Bande welche den respiratorischen Superkomplex $CICIII_2CIV$ (B) in den isolierten Mitochondrien von Sham (weiß) und TAC (schwarz) Tieren nach 20 Wochen kardialer Drucküberlastung repräsentiert. Mittelwert \pm SEM.

3.6 Mitochondriale Morphologie und Biogenese

Verschiedene Studien beschreiben Veränderungen in der mitochondrialen Morphologie (Drexler et al. 1992) oder Biogenese (Garnier et al. 2005) während einer Herzinsuffizienz sowohl im Herzmuskel, als auch im Skelettmuskel. Da Veränderungen in der Morphologie oder Biogenese ebenfalls zu den beobachteten Veränderungen in der respiratorischen Kapazität bzw. der Enzymaktivität führen können, wurde die Morphologie der Mitochondrien mittels Durchflusszytometrie und die Biogenese anhand der Genexpression diverser Schlüsselgene untersucht.

3.6.1 Mitochondriale Morphologie

Mittels der Durchflusszytometrie wurde die relative Größe, anhand des Vorwärtsstreulicht, sowie die Komplexität der Mitochondrien, anhand des Seitwärtsstreulicht, bestimmt. In diesem Experiment ist nur eine Kontrollgruppe für alle Zeitpunkte dargestellt. Es wurden für alle TAC Gruppen die entsprechenden Sham Gruppen gemessen, jedoch auf Grund der geringen Anzahl der Sham Tiere und der Gleichheit der gemessenen Werte, wurden alle Tiere zu einer großen Kontrollgruppe zusammengefasst.

In 31 A) und C) ist die relative Größe (Vorwärtsstreulicht) der Mitochondrien dargestellt, in B) und C) die Komplexität (Seitwärtsstreulicht). Die drei verschiedenfarbigen Balken repräsentieren die einzelnen Mitochondrienfraktion (IFM = weiß, SSM = schwarz; Soleus IFM/SSM = grau). Betrachtet man jede mitochondriale Population allein und vergleicht sie zur jeweiligen Kontrolle, so erkennt man keinen Unterschied in Bezug auf Größe oder Komplexität der Mitochondrien zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Weder zum Zeitpunkt einer kompensierten Herzhypertrophie noch nach Auftreten einer systolischen Dysfunktion zeigten sich Veränderung in Größe bzw. Komplexität.

Die beiden isolierten mitochondrialen Populationen, IFM und SSM, zeigten hinsichtlich der mitochondrialen Größe leichte Unterschiede. Sowohl im Herzmuskel, als auch im Gastrocnemiusmuskel schienen die subsarkolemmalen Mitochondrien im Vergleich zu den interfibrillären Mitochondrien größer zu sein. Ein Vergleich der Mitochondrien des Gastrocnemius mit den Mitochondrien des Soleus Muskels ist auf Grund der unterschiedlichen Isolationsverfahren nicht möglich.

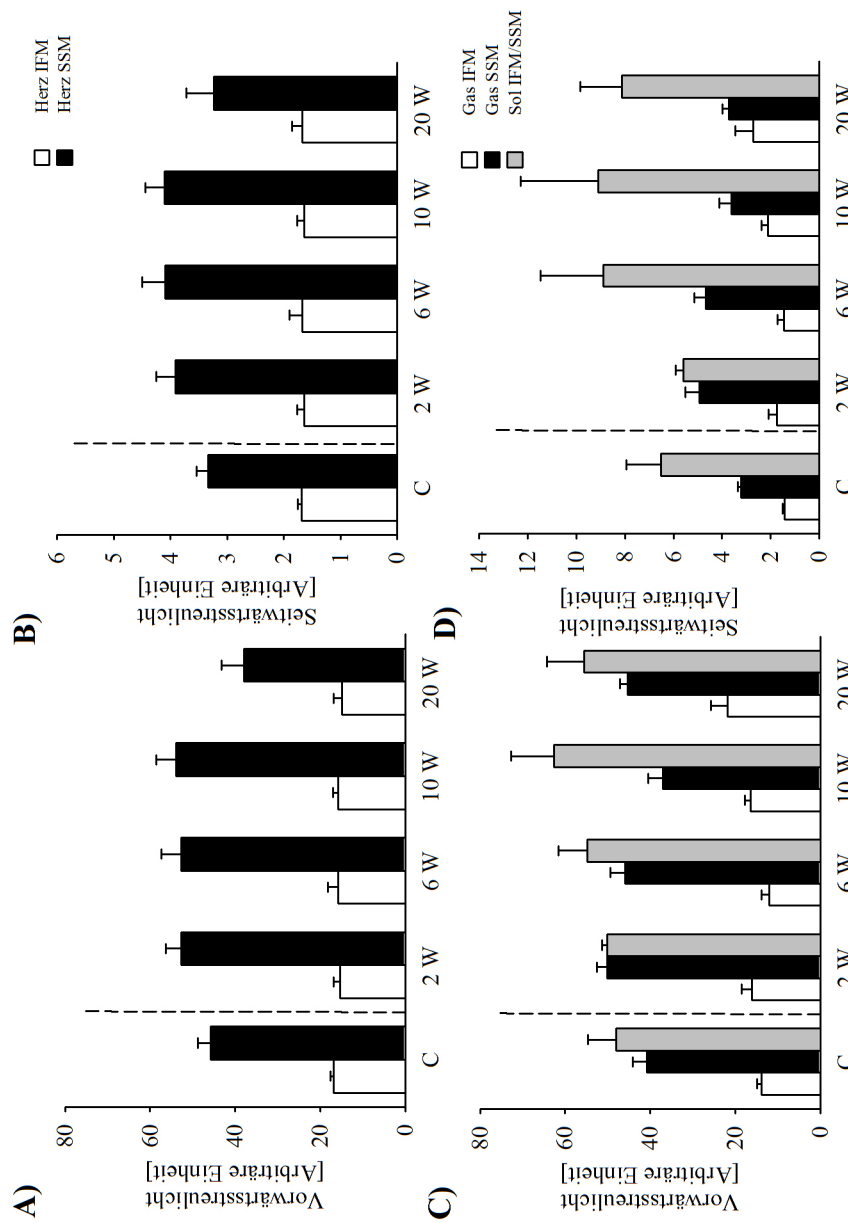


Abbildung 31: Durchflusszytometrie-Analyse isolierter Mitochondrien nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung. Die weißen Balken zeigen die interfibrillären (IFM) Mitochondrien, die schwarzen Balken die subsarkomemalen (SSM) Mitochondrien, die grauen Balken die Mischpopulation des Soleus Muskels. In A) und C) ist das Vorwärtsstreulichkeit, in B) und D) das Seitwärtsstreulichkeit dargestellt. Gas - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarkomemale Mitochondrien; C - Kontrollgruppe. Mittelwert \pm SEM

3.6.2 Marker der mitochondrialen Biogenese

Die Expression verschiedener Marker der mitochondrialen Biogenese war im Herzmuskel durch die kardiale Drucküberlastung stark beeinträchtigt (32 A)). Zwei Wochen kardiale Drucküberlastung führten zu einer signifikanten Reduktion der Expression von PGC-1 β und ERR α . Die Expression von PGC-1 α , NRF-1 und 2 war zu diesem Zeitpunkt leicht erniedrigt. Nach 6 Wochen war die Expression von PGC-1 β , NRF-1 und 2 sowie ERR α signifikant erniedrigt, die Expression von PGC-1 α war leicht erniedrigt. Zehn Wochen nach der Aortenstenose normalisierte sich die Expression von PGC-1 β , NRF-1 und 2, lediglich die Expression von PGC-1 α und ERR α zeigte weiterhin eine signifikante Erniedrigung. Zum Zeitpunkt der kontraktilen Dysfunktion blieb die Expression von PGC-1 α und ERR α weiterhin signifikant erniedrigt, die Expression der restlichen Marker war jedoch signifikant erhöht. In beiden Muskeln sind wenige Veränderungen zu beobachten. Im Gastrocnemius Muskel (32 B)) blieb die Expression von PGC-1 α , PGC-1 β und NRF-1 zu allen Untersuchungszeitpunkten unverändert. Der Transkriptionsfaktor NRF-2 ist nach 20 Wochen kardialer Drucküberlastung signifikant erniedrigt. Die Expression von ERR α war nach 6 und 10 Wochen signifikant erniedrigt, nach 20 Wochen jedoch sehr stark erhöht. Im Soleus Muskel (32 C)) zeigte sich nach 2, 6 und 10 Wochen kardialer Drucküberlastung keine Veränderung in der mRNA-Expression. Nach 20 Wochen zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Expression von PGC-1 α und eine starke Erhöhung der Expression von ERR α .

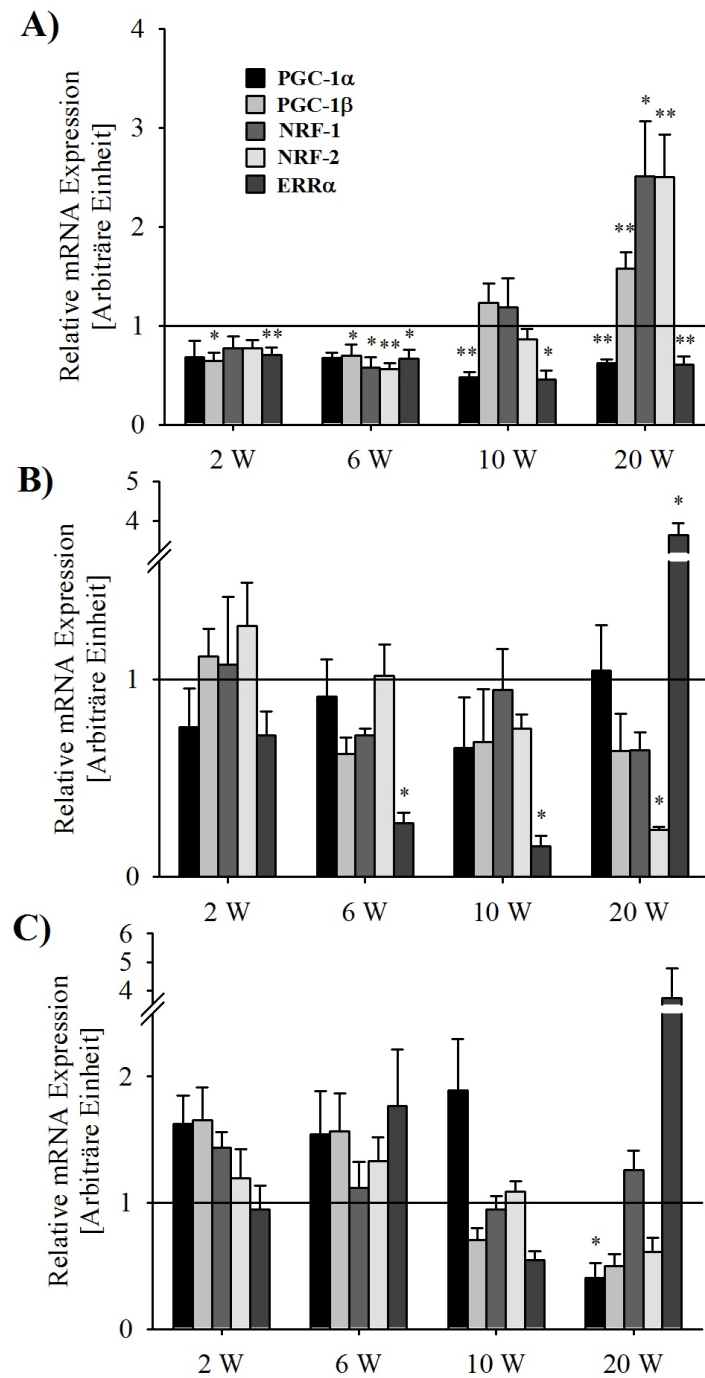


Abbildung 32: Relative mRNA-Expression verschiedener Schlüsselgene der mitochondrialen Biogenese im Herzmuskel A), im Gastrocnemius Muskel B) und im Soleus Muskel C) nach 2, 6, 10 und 20 Wochen (W) kardialer Drucküberlastung (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Kapitel 4

Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Entwicklung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz bei der Ratte drei Phasen durchlaufen werden, die klinisch relevanten Stadien der Herzinsuffizienz sehr ähnlich sind: 1.Phase: 2 Wochen Drucküberlastung - kompensierte Hypertrophie, 2.Phase: 6-10 Wochen Drucküberlastung - Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion (HFpEF), 3.Phase: 20 Wochen Drucküberlastung - Herzinsuffizienz mit systolischer Dysfunktion (HFrEF). Weiterhin wurde erstmals gezeigt, dass jeder Phase der Herzinsuffizienzentwicklung eine definierte mitochondriale Funktion zugeordnet werden kann: 1.Phase - gesteigerte mitochondriale Funktion, 2.Phase - normalisierte mitochondriale Funktion, 3.Phase - mitochondriale Dysfunktion. Bekannt ist, dass die mitochondriale Dysfunktion mit dem Auftreten einer systolischen Herzinsuffizienz assoziiert ist (Phase 3). In dieser Studie wurde jedoch erstmals gezeigt, dass es bereits Zeichen einer Herzinsuffizienz (HFpEF) gibt, ohne dass die mitochondriale Funktion messbar beeinträchtigt ist. Dies schließt eine mitochondriale Dysfunktion als primäre Ursache für das Auftreten einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz nahezu aus. Erstmals wurde zudem die Entwicklung der mitochondrialen Funktion während einer kardialen Drucküberlastung parallel in Herz- und Skelettmuskel untersucht. Die Parallelität der Befunde zwischen Herz- und Skelettmuskel deutet auf einen arbeitslastunabhängigen Mechanismus als Ursache für das Auftreten einer mitochondrialen Dysfunktion hin. Ebenfalls lässt diese Parallelität zwischen Herz- und Skelettmuskel die Vermutung zu, dass man von der mitochondrialen Funktion im Skelettmuskel auf die mitochondriale Funktion im Herzmuskel schließen kann.

Entstehung einer drucküberlastungsinduzierten Herzinsuffizienz

Die Auswertung der morphologischen und echokardiografischen Parameter führte zur Charakterisierung einzelner Entwicklungsstadien der Herzinsuffizienz in unserem Tiermodell: 2 Wochen Drucküberlastung - kompensierte Hypertrophie, 6-10 Wochen Drucküberlastung - Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion (HFpEF), 20 Wochen Drucküberlastung - Herzinsuffizienz mit systolischer Dysfunktion (HFrEF) (Abb. 33). Dieser Verlauf ähnelt der Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz durch eine Aortenstenose im Patienten. Im Menschen entwickelt sich die chronische Herzinsuffizienz im Verlauf von Monaten bis Jahren. Durch die Aortenstenose entsteht ein erhöhter Druckgradient zwischen prästenotischem und poststenotischem Abschnitt. Die chronisch erhöhte Nachlast führt zu einer konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels (Heineke u. Molkentin 2006; Katz 2006). Dies kann als kompensatorischer Mechanismus für das Aufrechterhalten des Pumpvolumens angesehen werden. Erst mit einer Dilatation des Ventrikels kommt es zu einem Abfall der Pumpleistung und zur Dekompensation. Resultat ist eine Herzinsuffizienz mit eingeschränkter systolischer Funktion, zu deren Symptomen unter anderem Oedeme zählen.

Im Tiermodell wurde eine genaue Charakterisierung der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bisher noch nicht gezeigt. Das Ziel einer experimentellen Studie ist die Induktion einer Herzinsuffizienz. Häufig wird jedoch nicht beachtet, dass die Herzinsuffizienz ein klinisches Syndrom ist, welches sich aus verschiedenen Parametern zusammensetzt und in der Schwere stark differiert. Im Tiermodell wird die Herzinsuffizienz oftmals nur durch einen Parameter definiert und andere ebenfalls aussagekräftige Parameter werden nicht gemessen bzw. nicht beurteilt. Dies führt zu unterschiedlichen Definitionen der Herzinsuffizienz und somit zu unterschiedlichen Schweregraden der Herzinsuffizienz. Die Entwicklung der jeweiligen Herzinsuffizienz wird dabei nicht untersucht bzw. charakterisiert. Dies erschwert einen Vergleich der Studien untereinander (De Sousa et al. 2002; Doenst et al. 2010; Lunde et al. 2006; Momken et al. 2003; Simonini et al. 1996b; Zoll et al. 2006). Auch bei der Verwendung des gleichen Herzinsuffizienzmodells, wird die Herzinsuffizienz mitunter unterschiedlich definiert (anhand der Zeit, der Kontraktilität, des Herzgewichtes, des Lungengewichtes, des Druckgradienten). Somit werden im gleichen Modell unterschiedliche Schweregrade der Herzinsuffizienz beschrieben (De Sousa et al. 2002; Doenst et al. 2010; Momken et al. 2003). Auf Grund dieser Variabilität der Definitionen ist es schwierig, sein eigenes Herzinsuffizienzmodell mit denen in der Literatur zu vergleichen. Eine

genaue Definition des Herzinsuffizienzgrades wäre von Nöten, um die mitochondriale Funktion, welche in der Herzinsuffizienzentwicklung großen Schwankungen unterliegt, in den einzelnen Studien miteinander vergleichen zu können.

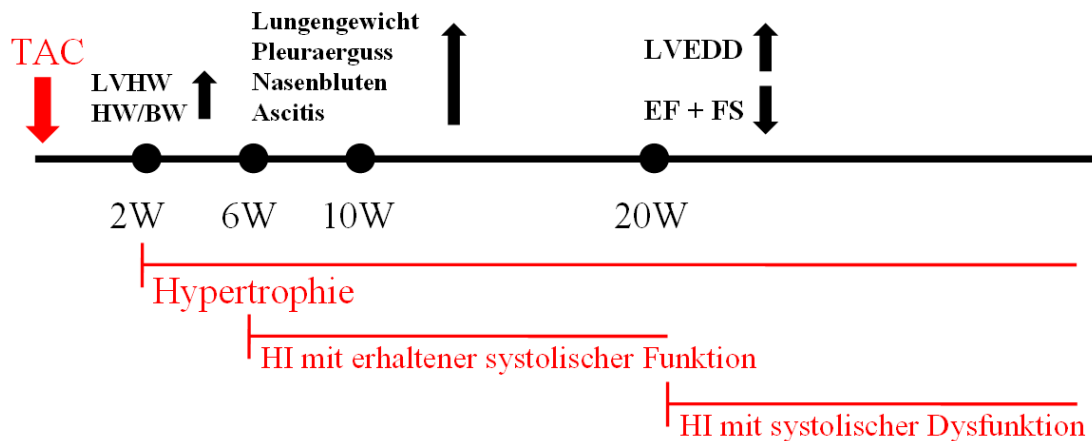


Abbildung 33: Entwicklung der kardialen Funktion nach einer Aortenstenose

TAC - Transverse Aortenkonstriktion; HI - Herzinsuffizienz; LVHW - linksventrikuläre Hinterwanddicke; HW - Herzgewicht; BW - Körpergewicht; LVEDD - linksventrikulärer Durchmesser während Diastole; EF - Auswurfraction; FS - Verkürzungsfraktion; W - Wochen)

Die mitochondriale Funktion in Herz- und Skelettmuskel während der Entstehung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz

Die mitochondriale Funktion veränderte sich schon kurzzeitig nach Induktion einer kardialen Drucküberlastung. So konnte jeder Phase der Herzinsuffizienzentwicklung eine definierte mitochondriale Funktion zugeordnet werden: 1.Phase - gesteigerte mitochondriale Funktion, 2. Phase - normalisierte mitochondriale Funktion, 3.Phase - mitochondriale Dysfunktion. Diese Funktionsänderungen beziehen sich auf die respiratorische Kapazität sowie die isolierte Komplexaktivität und konnten parallel in Herz- und Skelettmuskel beobachtet werden. Dass eine mitochondriale Dysfunktion in Herz- oder Skelettmuskel mit einer systolischen Herzinsuffizienz assoziiert ist, wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt (De Sousa et al. 2002; Garnier et al. 2003; Rosca et al. 2008; Zoll et al. 2006). Die Entdeckung, dass die mitochondriale Dysfunktion gleichzeitig und somit parallel in Herz- und Skelettmuskel auftritt, ist jedoch neu und wurde in dieser Form bisher noch nicht gezeigt. Weiterhin wurde in dieser Arbeit erstmalig der Verlauf

der mitochondrialen Funktion während der Entstehung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz gezeigt.

Die frühzeitige Veränderung der Mitochondrien ist durch einen Anstieg der respiratorischen Kapazität und der Aktivität der Atmungskettenkomplexe gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu, ist die Citratsynthaseaktivität im Homogenat nach 2 Wochen reduziert. Es ist schwierig diese Ergebnisse mit anderen Studien zu vergleichen, da nur wenige Studien die Phase der kompensierten Hypertrophie untersucht haben. Sparagna et al. untersuchten in Spontan-Hypertensiven Ratten die Entwicklung der Hypertrophie (Sparagna et al. 2007). In diesem Modell entwickeln die Tiere im Alter von ca. 2 Monaten eine Hypertrophie, welche sich im Alter von ca. 2 Jahren zu einer Herzinsuffizienz entwickeln kann. Die Autoren untersuchten in isolierten Mitochondrien die Citratsynthaseaktivität und die Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase. Sie fanden, dass die Citratsynthase über den gesamten Entwicklungszeitraum unverändert blieb, die Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase jedoch schon während der Hypertrophie reduziert war. Kindo et al. untersuchten die mitochondriale Funktion nach einer abdominalen Aortenzügelung. Nach 6 Wochen zeigten diese Herzen eine leichte Hypertrophie, bei normaler kontraktile Funktion, jedoch eine deutlich eingeschränkte respiratorische Kapazität (Kindo et al. 2012). Im Gegensatz zu diesen zwei Studien, welche eine Reduktion mitochondrialer Funktionen während einer Hypertrophie fanden, gibt es auch Studien die eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion beschreiben. Maurer et al. beschreiben das Konzept der »Stable Hyperfunction«, welches die erhöhte mitochondriale Funktion auf den erhöhten Energiebedarf des hypertrophierten Ventrikels zurückführt. Sie zeigten in Patienten, dass die mitochondriale Funktion positiv mit dem Druckgradienten über der Aortenklappe während einer Aortenstenose korreliert (Maurer u. Ziers 1992). Im Tiermodell der drucküberlastungsinduzierten Hypertrophie zeigten Sink et al. ebenfalls eine erhöhte mitochondriale Funktion (Sink et al. 1981). Die Gründe für die verschiedenen Befunde zwischen dieser Studie und den Studien, welche eine eingeschränkte mitochondriale Funktion beschreiben, sind vielfältig. Zum einen unterscheidet sich das Tiermodell und der Untersuchungszeitpunkt, aber auch die Messmethoden variieren deutlich. Ein weiterer Punkt der diese Arbeit von den anderen Studien unterscheidet ist das Alter der untersuchten Tiere.

Wir verwendeten in unserem Tiermodell Ratten im Alter von 3 Wochen. Zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten waren diese Tiere demnach 5, 9, 13 und ca. 23 Wochen alt.

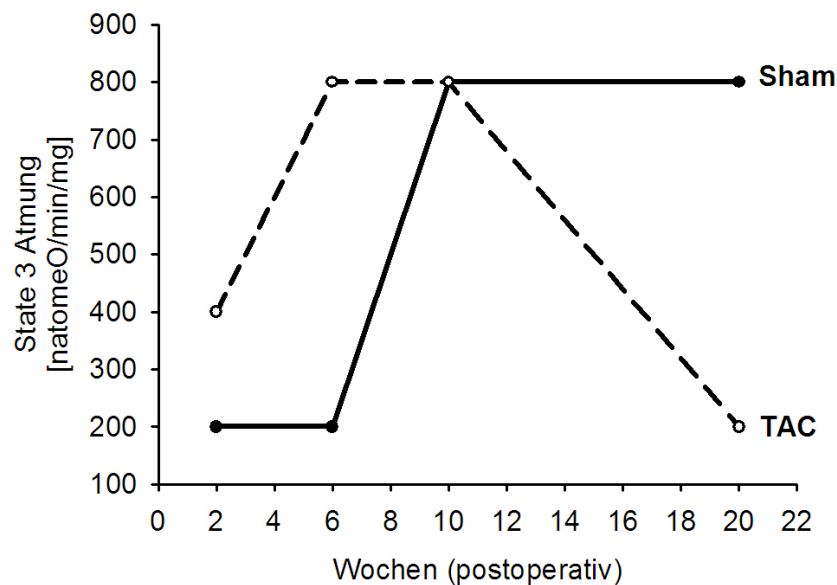


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Entwicklung der respiratorischen Kapazität während der Entstehung einer Herzinsuffizienz.

Ratten werden mit 3 Wochen entwöhnt, mit ca. 8 Wochen geschlechtsreif und gelten ab ca. 12 Wochen als adulte Tiere. In Abbildung 34 ist der zeitliche Verlauf der RC in den Sham und TAC Tieren schematisch dargestellt. In den Sham Tieren blieb die RC während der ersten 6 Wochen konstant niedrig und stieg dann innerhalb der nächsten 4 Wochen steil an. Ab der 10. Woche blieb die RC auf dem erhöhten Niveau. In den TAC Tieren hingegen war die RC bereits nach 2 Wochen Drucküberlastung erhöht, stieg bis zur 6. Woche an und blieb bis zur 10. Woche stabil. Mit Auftreten der systolischen Dysfunktion fiel die RC in den TAC Tieren. Dieser Verlauf, in Sham und TAC Tieren, ist sowohl im Herzen, als auch im Skelettmuskel zu beobachten. Iossa et al. zeigten, dass die State 3 Atmung in 180 Tage alten Ratten im Vergleich zu 60 Tage alten Ratten erhöht ist (Iossa et al. 2004). Im Vergleich zu unseren Tieren entsprechen die 60 Tage alten Tiere in etwa unseren 6W - Tieren sowie die 180 Tage alten Tiere unseren 20W - Tieren. Weiterhin zeigten Marin-Garcia et al., dass in jungen Ratten die Aktivität der Komplexe I, III, IV und V niedriger ist als in adulten Tieren (Marin-Garcia et al. 1997). In den Tabellen 15-18 (Anhang) sind die Absolutwerte der Komplexaktivitäten gezeigt. Deutlich ist eine Zunahme der Aktivität im zeitlichen Verlauf in den Sham Tieren zu beobachten. Die Ergebnisse dieser zwei Studien (Iossa et al. 2004; Marin-Garcia et al. 1997) entsprechen unseren Beobachtungen hinsichtlich der RC und der Komplexaktivität. Die Zunahme der

mitochondrialen Funktion in den Sham Tieren kann demnach einem altersabhängigen Effekt zugeschrieben werden. In den TAC Tieren kann auch das Alter für die beobachtete erhöhte mitochondriale Funktion verantwortlich sein. Jedoch sehen wir den Anstieg der Funktion bereits zum 2W Zeitpunkt, dass heißt in den TAC Tieren ist die mitochondriale Funktion im Vergleich zu den Sham Tieren sehr viel zeitiger erhöht.

Die Reduktion der mitochondrialen Funktion in Herz- und Skelettmuskel, zum Zeitpunkt der systolischen Dysfunktion, entspricht den Befunden aktueller Studien. So zeigen verschiedene Studien, welche entweder den Herzmuskel oder den Skelettmuskel untersucht haben, dass die respiratorische Kapazität während einer durch Aortenstenose induzierten Herzinsuffizienz stark erniedrigt ist (De Sousa et al. 2002, 2000; Garnier et al. 2003; Momken et al. 2003). Ein Myokard-Infarkt führt ebenfalls zu einer Reduktion der respiratorischen Kapazität in Herz- oder Skelettmuskel (Heather et al. 2010; Zoll et al. 2006). Ein weiteres Modell, in dem die mitochondriale Funktion untersucht wurde, ist das der Schrittmacherstimulation des Herzens im Hund. Die respiratorische Kapazität in den isolierten Mitochondrien des Herzens (Rosca et al. 2008) sowie des Gastrocnemius (Rosca et al. 2009) war sowohl mit Komplex I, als auch mit Komplex III Substraten deutlich erniedrigt. Die Aktivität mitochondrialer Enzyme wurde ebenfalls in der Herzinsuffizienz untersucht. Rosca et al. zeigten im Schrittmachermodell, dass die Aktivität der Citratsynthese im Herzen unverändert, im Skelettmuskel jedoch reduziert war. Die Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe war bis auf eine Reduktion der Succinatdehydrogenase-Aktivität im Herzen unverändert (Rosca et al. 2009, 2008). Marin-Garcia et al. fanden im gleichen Tiermodell eine unveränderte Citratsynthese-Aktivität sowie eine Reduktion der Komplex III und V Aktivität in Herz und Gastrocnemius (Ananthakrishnan et al. 2005; Marin-Garcia et al. 2001). Im Myokardinfarkt zeigten Heather et al. eine Reduktion der Komplex III Aktivität im Herzen (Heather et al. 2010) und Simonini et al. eine Reduktion der Citratsyntheseaktivität im Skelettmuskel (Simonini et al. 1996a). Die Ergebnisse bezüglich der Aktivität mitochondrialer Enzyme sind sehr verschieden. Diese Differenzen sind vermutlich durch Unterschiede in den Studien bezüglich Tiermodell und Messmethode zu begründen.

In unserem Tiermodell sehen wir eine steigende mitochondriale Funktion während des Übergangs der juvenilen zur adulten Phase, welche in den TAC Tieren zeitiger auftritt und einen Abfall der mitochondrialen Funktion mit Auftreten der systolischen Dysfunktion

in den TAC Tieren. Ein Faktor, welcher einen großen Einfluss auf die mitochondriale Funktion hat ist das Insulin. Über die Insulinsignalkaskade (IRS-PI3K-Akt, AMPK) kann Insulin direkten Einfluss auf PGC-1 α nehmen (Cheng et al. 2010; Sonntag et al. 2012; Turner u. Heilbronn 2008). Der altersbedingte Anstieg der mitochondrialen Funktion in den Sham Tieren kann durch einen Anstieg der Insulin Konzentration verursacht werden. Iossa et al. zeigten, dass die Insulinkonzentration im Blut mit dem Erreichen der Geschlechtsreife ansteigt (Iossa et al. 2004). Durch diese erhöhten Insulinspiegel, könnte die mitochondriale Biogenese in den Sham und TAC Tieren während der juvenilen Phase gesteigert werden, indem PGC-1 α über AMPK und SirT1 aktiviert wird (Cheng et al. 2010). In gezügelten Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Insulinspiegel bereits nach 2 Wochen Drucküberlastung deutlich erhöht ist (Shimizu et al. 2010). Diese Beobachtung von Shimizu et al. kann eine Erklärung für den früheren Anstieg der mitochondrialen Funktion in den TAC Tieren darstellen. Eine mögliche Ursache für den Rückgang der mitochondrialen Funktion während der systolischen Dysfunktion könnte eine Verschlechterung der Insulinempfindlichkeit sein. Mit der hyperinsulinämen-euglykämischen Klemme sowie der isolierten Herzperfusion fanden wir zum Zeitpunkt der systolischen Dysfunktion eine eingeschränkte Insulinempfindlichkeit des Herzens sowie des Soleus Muskels ((Schwarzer et al. 2010); unveröffentlichte Beobachtung). Weitere Befunde lassen vermuten, dass die Insulinsignalkaskade zum Zeitpunkt einer systolischen Dysfunktion gestört ist (Schwarzer et al. 2012). Dies deutet darauf hin, dass eine gestörte Signalkaskade und damit eine Störung der mitochondrialen Biogenese für die beobachtete mitochondriale Dysfunktion verantwortlich sein könnte. Die Veränderungen in der Insulinsignalkaskade sollen hier nicht weiter besprochen werden, da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit waren. Im folgenden Abschnitt hingegen werden weitere mögliche exogene und endogene Faktoren für mitochondriale Dysfunktion diskutiert.

Endogene und exogene Faktoren für eine mitochondriale Dysfunktion

Die Funktion der Mitochondrien wird durch verschiedene endogene und exogene Prozesse beeinflusst. Endogene Veränderungen, die eine solche Funktionsänderung beeinflussen können, sind unter anderem Veränderungen auf Ebene der Gen- und Proteinexpression (Garnier et al. 2003), Veränderungen in der Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten bzw. der Atmungskettenkomplexe zu Respirasomen (Rosca et al. 2008) oder auch Veränderungen in der mitochondrialen Biogenese (Garnier et al. 2003, 2005; Rimbaud et al. 2009; Sebastiani et al. 2007) bzw. der mitochondrialen

Morphologie (Bugger et al. 2010; Drexler et al. 1992).

Die Lage der Mitochondrien (interfibrillär oder subsarkolemmal) bzw. deren Morphologie können einen großen Einfluss auf die mitochondriale Funktion zeigen. Mittels der Durchflusszytometrie kann zwar keine direkte Aussage über die Oberflächengröße der mitochondrialen Cristae getroffen werden, jedoch kann gut die relative Größe sowie die strukturelle Komplexität der Mitochondrien bestimmt werden. Die erhöhte Nachlast zeigte keinen Einfluss auf die Größe bzw. die strukturelle Komplexität der Mitochondrien (IFM + SSM) im Herz- und Skelettmuskel. Auffällig war jedoch, dass die SSM des Herzen, aber auch des Gastrocnemius, wesentlich größer und auch komplexer erschienen als die IFM des jeweiligen Muskels. Dies entspricht den Angaben in der Literatur (Dabkowski et al. 2009) und ist wahrscheinlich durch die Lage der Mitochondrien zu erklären (IFM - zwischen den Fibrillen; SSM - unterhalb Sarkolemm). In beiden Subpopulationen konnte der biphasische Verlauf der mitochondrialen Funktion beobachtet werden, so dass man daraus schließen kann, dass die kardiale Drucküberlastung sowohl IFM als auch SSM beeinflusst.

Einen wesentlichen Einfluss auf Morphologie und Funktion der Mitochondrien hat die mitochondriale Biogenese. Ein Hauptakteur der mitochondrialen Biogenese ist PGC-1 α . Viele Studien zeigten, dass PGC-1 α und somit die mitochondriale Biogenese während der Herzinsuffizienz herabreguliert sind und so eine mitochondriale Dysfunktion verursachen können (Garnier et al. 2003, 2005; Rimbaud et al. 2009). Während der ersten 10 Wochen Nachlastserhöhung war die Genexpression von PGC-1 α und β unverändert. Mit Auftreten der kontraktilen Dysfunktion wurde eine reduzierte mRNA-Expression von PGC-1 α im Herz- und im Soleusmuskel sowie eine Reduktion von NRF-2 im Gastrocnemius gezeigt werden. Gleichzeitig aber zeigten andere wichtige Akteure der mitochondrialen Biogenese eine erhöhte mRNA-Expression. Im Herzmuskel war die Expression von NRF-1/2 und im Skelettmuskel die Expression von ERR α erhöht. Diese drei Transkriptionsfaktoren werden von PGC-1 α aktiviert und regulieren direkt die Expression der Atmungskettengene (Puigserver u. Spiegelman 2003; Wu et al. 1999). Es ist vorstellbar, dass diese Transkriptionsfaktoren kompensatorisch vermehrt exprimiert werden. Für diese kompensatorische Heraufregulation könnte beispielsweise PGC-1 β in Frage kommen, welcher eine große Homologie mit PGC-1 α aufweist und vermutlich auch eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Biogenese spielt (Kelly u. Scarpulla 2004). Einige Autoren vermuten weiterhin, dass ERR α Funktionen von PGC-1 α übernehmen

kann (Schreiber et al. 2004). Demnach ist es möglich, dass eine Reduktion von PGC-1 α durch eine vermehrte Expression von ER α kompensiert wird. Des Weiteren gibt es auch posttranskriptionelle Faktoren welche die Funktion von PGC-1 α und anderen Transkriptionsfaktoren beeinflussen können. Zum Beispiel zeigten Nemoto et al., dass PGC-1 α durch SirT1 deacetyliert und somit erst aktiviert wird (Nemoto et al. 2005). Unsere Ergebnisse in der Herzinsuffizienz zeigen jedoch, dass die mRNA Expression der mitochondrialen Biogenesemarker nicht einheitlich herabreguliert ist und somit keine eindeutige Erklärung für die beobachtete Reduktion der mitochondrialen Funktion liefern.

Die Expression der Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette wurde auf Gen- und Proteinebene untersucht. Dabei wurden verschiedene nukleär kodierte Untereinheiten detektiert. Eine komplette Analyse der mRNA bzw. der Proteinexpression der einzelnen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe während der Entstehung einer Herzinsuffizienz gibt es bislang nicht. In einer 2010 von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Studie wurde in einer Proteom-Analyse gezeigt, dass im Herzmuskel während einer systolischen Dysfunktion die Menge an Atmungskettenproteinen stark reduziert ist (Bugger et al. 2010). Andere Studien untersuchten ebenfalls die Expression einzelner Untereinheiten und fanden eine Reduktion in der Expression der Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinatdehydrogenase (Simonini et al. 1996b) bzw. eine Reduktion der COXIV Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (Garnier et al. 2003). Ich konnte mittels der durchgeführten Untersuchungen keine einheitliche Störung innerhalb der Gen- bzw. Proteinexpression der Atmungskettenuntereinheiten finden. Es wurde in dieser Arbeit jedoch nur ein Teil der Komplexuntereinheiten und zudem nur nukleär kodierte Untereinheiten untersucht. Es gibt jedoch auch 13 Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe, die durch das Mitochondrium selbst kodiert werden. Einige Studien vermuteten, dass ein Defekt auf Seiten dieser mtDNA für die beobachteten Defizite verantwortlich ist. Der Gehalt an mtDNA wurde mehrfach im Herz- und im Skelettmuskel untersucht, es wurden jedoch keine Veränderungen gefunden (Garnier et al. 2003; Sack et al. 1996). Im Gegensatz zur gesamten mtDNA Menge zeigten Studien, dass die Expression verschiedener mitochondrial verschlüsselter Untereinheiten während einer Herzinsuffizienz in Herz- und Skelettmuskel stark erniedrigt ist (Garnier et al. 2003; Ide et al. 2001; Simonini et al. 1996b). Ide et al. fanden des Weiteren, dass die rein nukleär verschlüsselten Enzyme (CS, SDH) während einer Herzinsuffizienz uneingeschränkt arbeiteten und folgerten daraus, dass der Defekt ausschließlich durch Schäden an der

mtDNA verursacht wird (Ide et al. 2001). Jedoch erscheint die Vermutung eines alleinigen mtDNA Defektes in unserem Modell sehr unwahrscheinlich. Zum einen fanden wir eine reduzierte Citratsynthaseaktivität sowie eine reduzierte Succinatdehydrogenaseaktivität. Beides sind Enzyme, die ausschließlich nukleär verschlüsselt werden. Zum anderen haben wir die Schädigung der mtDNA während einer Herzinsuffizienz im Herzen bestimmt (unveröffentlichte Beobachtungen) und fanden keinen Unterschied zu den Kontrolltieren. Diesen Erkenntnissen zu Folge ist es unwahrscheinlich, dass die beobachtete mitochondriale Dysfunktion allein durch Schäden an der mtDNA sowie durch fehlerhafte Expression der Komplexuntereinheiten zu erklären ist. Eine weitere mögliche Ursache für die eingeschränkte RC könnte in der Menge an Respirasomen liegen.

Wie eingangs erwähnt, wird angenommen, dass die Atmungskettenkomplexe nicht einzeln in der Mitochondrienmembran vorliegen sondern zur Optimierung ihrer Funktion zu sogenannten Respirasomen zusammengeschlossen sind. Eine einzige Studie untersuchte bisher die Menge an Respirasomen während einer Herzinsuffizienz. Rosca et al. fanden in der Herzinsuffizienz, dass die Menge an Respirasomen im Herzen reduziert ist (Rosca et al. 2008). Sie vermuteten, dass eine verminderte Menge an Respirasomen zu einer Erniedrigung der respiratorischen Kapazität führt, in Folge derer es zu einer erhöhten ROS Produktion kommt und somit die Atmungskettenkomplexe geschädigt werden (Rosca u. Hoppel 2009). Diese Vermutung konnten wir mit unseren durchgeführten Experimenten nicht bestätigen. Zum Zeitpunkt der systolischen Dysfunktion fanden wir keine Reduktion in der Menge an Respirasomen.

Die Untersuchung des oxidativen Teils der Atmungskette (Komplex I-IV) lieferte keine Erklärung für den gemessenen Funktionsverlust der Atmungskettenkomplexe. Auf Grund dessen haben wir uns weiterhin den phosphorylierenden Teil der Atmungskette angeschaut. Dieser umfasst die ATP-Synthase, die Adeninnukleotid-Translokase sowie die Phosphattransporter (Chen et al. 2004). Es gibt Studien, welche einen Defekt auf der phosphorylierenden Seite der Atmungskette als Ursache für eine eingeschränkte mitochondriale Funktion vermuten (Dorner u. Schultheiss 2000; Rosca et al. 2009). Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Adeninnukleotid-Translokase (ANT), deren Aufgabe es ist, ADP und ATP zwischen der Matrix und dem Intermembranraum auszutauschen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Herzen die mRNA Expression von ANT1 über den gesamten Zeitraum hinweg erniedrigt ist und auch

zum Zeitpunkt der kontraktilen Dysfunktion die Expression im Skelettmuskel signifikant reduziert ist. Eine verminderte Menge an ANT kann zu einer Akkumulation von ATP in der Matrix führen, welche die Atmungskette inhibieren könnte (Dörner u. Schultheiss 2007). Eine künstliche Aufhebung des Protonengradienten (Entkopplung mit DNP) sollte diesen Missstand und die damit verbundene Inhibierung beheben und eine normale Atmung ermöglichen. Die Gabe von DNP bewirkte jedoch keine Änderung in der RC. Durch diesen Befund kann ein Missstand an der ATP-Synthase, hervorgerufen durch einen Defekt der ATP-Synthase, einer Akkumulation von ATP oder einer Dysfunktion des Phosphattransportes, in unserem Modell nahezu ausgeschlossen werden.

Ein arbeitslastunabhängiger Mechanismus

In den vorherigen Abschnitten wurden mögliche molekulare Mechanismen diskutiert, welche für die beobachteten mitochondrialen Veränderungen ursächlich verantwortlich sein könnten. Es bleibt offen, wie diese Veränderungen ausgelöst werden. Bisher wurde angenommen, dass die molekularen Veränderungen im Herzmuskel direkt durch die veränderte Nachlast und damit erhöhte Arbeitslast entstehen. Zwei Erkenntnisse widersprechen dieser Annahme. Erstens: wir beobachten molekulare sowie mitochondriale Veränderungen nicht nur im Herzen, sondern gleichzeitig auch im Skelettmuskel. Dieser ist im Gegensatz zum Herzen keiner erhöhten Arbeitslast ausgesetzt. Des Weiteren treten diese Veränderungen im Skelettmuskel schon sehr frühzeitig auf, zu einem Zeitpunkt, an dem das Herz noch keine funktionelle Einschränkung zeigt und somit der Einfluss der veränderten kardialen Arbeitslast auf den Skelettmuskel als sehr gering einzustufen ist. Zweitens: Andere Studien zeigen ebenfalls eine veränderte mitochondriale Funktion im Herzen, obwohl deren Herzinsuffizienzmodelle nicht auf einer erhöhten Nachlast basieren. Heather et al. (Heather et al. 2010) induzierten durch Okklusion einer Koronararterie eine ischämische Herzinsuffizienz, Rosca et al. induzierten eine Herzinsuffizienz durch Stimulation mit Schrittmachersonden (Rosca et al. 2008). Beide Studien zeigten eine reduzierte State-3-Atmung in den Mitochondrien des Herzmuskels. Diese drei Modelle (Aortenstenose, Myokardinfarkt, Schrittmacherstimulation) unterscheiden sich von Grund auf in der Induktion einer Herzinsuffizienz und beeinflussen die kardiale Arbeitslast unterschiedlich stark. Dennoch zeigen alle drei Modelle vergleichbare mitochondrialen Veränderungen im Herzmuskel. Rosca et al. untersuchten ebenfalls die mitochondriale Funktion im Skelettmuskel und fanden ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit (Rosca et al. 2009).

Diese Beobachtungen erlauben den Schluss, dass ein Mechanismus unabhängig bzw. nicht direkt abhängig der kardialen Arbeitslast existieren kann (»workload-independent«), welcher für die beobachteten mitochondrialen Veränderungen in Herz- und Skelettmuskel verantwortlich ist. Ursache und Vermittlung dieses Mechanismus sind bisher rein spekulativ. Anzunehmen ist, dass es durch die veränderten Arbeitslastbedingungen des Herzens zur Freisetzung von zirkulierenden Stoffen kommt. Die Annahme, dass diese Stoffe in der Blutbahn zirkulieren, wird durch die gleichzeitige Beeinträchtigung von Herz und Skelettmuskel gestützt. In welche Kategorie dieser zirkulierende Stoff einzuordnen ist, ist bisher völlig unbekannt. Man weiß, dass verschiedene Stoffe durch eine kardiale Drucküberlastung vermehrt/vermindert ausgeschüttet werden. Dazu zählen Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ (Ananthakrishnan et al. 2005), Hormone wie ANP/BNP (Cavallero et al. 2007), Angiotensin und Insulin (Shimizu et al. 2010), Katecholamine oder andere Proteine wie Apelin (Falcão-Pires et al. 2010), Adiponektin (Van Berendoncks et al. 2010) oder Leptin (Schulze et al. 2003). Wie diese veränderten Spiegel sich auf das Mitochondrium bzw. deren Funktion auswirken können ist bisher wenig bis gar nicht bekannt.

Im Gegensatz zur Annahme das ein zirkulierender Stoff die Veränderungen im Skelettmuskel auslöst, steht die Theorie, dass eine Atrophie des Skelettmuskels für die mitochondriale Dysfunktion im Skelettmuskel verantwortlich ist (Drexler 1992; Mancini et al. 1992). Im Patienten kann die Atrophie durch eine verminderte körperliche Bewegung entstehen. Diese resultiert aus einer eingeschränkten Bewegungstoleranz, ausgelöst durch die Herzinsuffizienz und/oder einem »Schonverhalten«. Viele Studien am Tiermodell zeigen, dass im Gegensatz zum Menschen, an Herzinsuffizienz leidende Tiere kein natürliches Bewegungsdefizit aufweisen (Simonini et al. 1996a; Teerlink u. Clozel 1993; Witte et al. 2000). In Herzinsuffizienzstudien an Tieren wurde teilweise eine Atrophie des Skelettmuskels gezeigt (De Sousa et al. 2000; Garnier et al. 2003; Libera et al. 2009; Simonini et al. 1996b) oder aber auch das Fehlen dieser (Libera et al. 1999; Lunde et al. 2006; Vescovo et al. 1998). Wir fanden in unseren untersuchten Ratten jedoch keine Anzeichen für eine Atrophie des Skelettmuskels, so dass dies als Ursache für die mitochondriale Dysfunktion ausgeschlossen werden kann (Muskelgewicht, Atrophieindex).

Schlußfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz in drei Phasen gegliedert werden kann: 1.Phase: 2 Wochen Drucküberlastung - kompensierte Hypertrophie, 2.Phase: 6-10 Wochen Drucküberlastung - Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion (HFpEF), 3.Phase: 20 Wochen Drucküberlastung - Herzinsuffizienz mit systolischer Dysfunktion (HFrEF). Weiterhin wurde erstmals gezeigt, dass jeder Phase der Herzinsuffizienzentwicklung eine definierte mitochondriale Funktion zugeordnet werden kann: 1.Phase - gesteigerte mitochondriale Funktion, 2.Phase - normalisierte mitochondriale Funktion, 3.Phase - mitochondriale Dysfunktion.

Das Auftreten einer systolischen Herzinsuffizienz (HFrEF) bei kardialer Drucküberlastung in Ratten ist mit einer mitochondrialen Dysfunktion sowohl in Herz- als auch Skelettmuskel verbunden. Es gibt jedoch bereits Zeichen einer Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion (HFpEF), ohne dass eine mitochondriale Dysfunktion vorliegt. Dies schließt eine mitochondriale Dysfunktion als primäre Ursache für das Auftreten einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz mit großer Wahrscheinlichkeit aus. Weiterhin weist die Parallelität zwischen Herz- und Skelettmuskel auf einen Mechanismus unabhängig der kardialen Drucküberlastung als Ursache einer mitochondrialen Dysfunktion hin. Möglicherweise haben humorale Faktoren sowohl Einfluss auf die mitochondriale Funktion des Herz- wie auch des Skelettmuskels. Diese humoralen Faktoren wurden in dieser Arbeit nicht näher behandelt, sind jedoch Gegenstand weiterer Forschung.

Kapitel 5

Anhang

Tabelle 15: Enzymaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$] des Atmungskettenkomplexes I in isolierten Mitochondrien des Herzens und des Skelettmuskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung.

	2 Wochen		6 Wochen		10 Wochen		20 Wochen	
	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC
Herz IFM	543 ± 60,8	391 ± 32,6	1111 ± 113	1094 ± 54,2	773 ± 77,3	573 ± 28,3†	976 ± 54,1	705 ± 62,3†
Herz SSM	482 ± 71,5	585 ± 57,9	999 ± 175	1151 ± 62,3	974 ± 79,8	666 ± 42,3†	1114 ± 89,8	785 ± 45,5†
Gas IFM	86,6 ± 4,32	268 ± 42,4†	245 ± 49,1	276 ± 24,0	293 ± 15,2	204 ± 30,6 †	268 ± 19,1	109 ± 28,0 †
Gas SSM	14,7 ± 2,41	241 ± 30,0 †	68,3 ± 6,28	276 ± 70,6 †	251 ± 57,3	266 ± 50,9	271 ± 47,3	78,3 ± 31,5 †
Sol	43,8 ± 5,71	90,2 ± 6,20 †	52,8 ± 18,2	65,3 ± 13,8	108 ± 36,3	106 ± 22,1	160 ± 16,0	67,5 ± 24,4 †
IFM/SSM								

Gas - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarcolemmale Mitochondrien

Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein; [†] $p < 0,05$; [‡] $p < 0,001$

Tabelle 16: Enzymaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$] des Atmungskettenkomplexes II in isolierten Mitochondrien des Herzens und des Skelettmuskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung.

	2 Wochen			6 Wochen			10 Wochen			20 Wochen		
	Sham	TAC		Sham	TAC		Sham	TAC		Sham	TAC	
Herz IFM	40,1 \pm 4,7	41,9 \pm 4,8		73,1 \pm 10,0	60,0 \pm 4,7		40,6 \pm 5,0	50,6 \pm 10,6		49,8 \pm 7,3	49,0 \pm 4,2	
Herz SSM	42,6 \pm 4,8	43,4 \pm 1,8		56,7 \pm 11,3	55,3 \pm 4,1		58,4 \pm 5,3	55,0 \pm 8,1		53,4 \pm 7,6	54,6 \pm 4,3	
Gas IFM	13,7 \pm 0,68	37,2 \pm 6,39 †		16,4 \pm 3,48	39,1 \pm 3,47 †		28,3 \pm 3,80	22,6 \pm 6,46		26,9 \pm 2,77	13,8 \pm 4,75 †	
Gas SSM	7,71 \pm 1,83	23,0 \pm 3,41 †		5,56 \pm 0,50	32,9 \pm 2,92 †		34,6 \pm 6,52	22,1 \pm 4,47		34,8 \pm 4,95	17,0 \pm 6,16 †	
Sol	5,77 \pm 0,69	9,55 \pm 1,93		6,12 \pm 2,27	10,6 \pm 1,69		11,4 \pm 4,49	8,26 \pm 1,75		18,5 \pm 2,73	7,52 \pm 2,86	
IFM/SSM												

Gas - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarcolemmale Mitochondrien

Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein; † p < 0,05; ‡ p < 0,001

Tabelle 17: Enzymaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$] des Atmungskettenkomplexes III in isolierten Mitochondrien des Herzens und des Skelettmuskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung.

	2 Wochen		6 Wochen		10 Wochen		20 Wochen	
	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC	Sham	TAC
Herz IFM	7376 ± 915	7131 ± 694	5919 ± 567	7313 ± 1426	8159 ± 591	8264 ± 1277	8936 ± 485	8327 ± 679
Herz SSM	5544 ± 909	5365 ± 238	4367 ± 542	6233 ± 1251	8541 ± 641	8591 ± 1065	9654 ± 1286	7349 ± 1130
Gas IFM	6516 ± 724	3892 ± 806 †	4393 ± 509	3825 ± 486	4211 ± 574	3053 ± 843	3833 ± 459	1976 ± 232 †
Gas SSM	4242 ± 878	2484 ± 568	1530 ± 327	2986 ± 420 †	5430 ± 948	2450 ± 599 †	4963 ± 672	2645 ± 312 †
Sol	2725 ± 273	1462 ± 508	1868 ± 194	1834 ± 549	1883 ± 437	1032 ± 237	1660 ± 300	1222 ± 330
IFM/SSM								

Gas - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarcolemmale Mitochondrien

Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein; † $p < 0,05$; ‡ $p < 0,001$

Tabelle 18: Enzymaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$] des Atmungskettenkomplexes IV in isolierten Mitochondrien des Herzens und des Skelettmuskels nach 2, 6, 10 und 20 Wochen kardialer Drucküberlastung.

	2 Wochen			6 Wochen			10 Wochen			20 Wochen		
	Sham	TAC		Sham	TAC		Sham	TAC		Sham	TAC	
Herz IFM	14230 \pm 1329	11120 \pm 959		19768 \pm 2044	18245 \pm 223		14559 \pm 1104	13373 \pm 1763		16334 \pm 1907	14544 \pm 775	
Herz SSM	10624 \pm 1661	14125 \pm 805		15197 \pm 1289	15765 \pm 231		15877 \pm 904	12695 \pm 1751		17956 \pm 1247	13765 \pm 1393	
Gas IFM	9147 \pm 761	7136 \pm 726		8990 \pm 745	7189 \pm 802		7593 \pm 717	5627 \pm 644		7085 \pm 621	5056 \pm 606	
Gas SSM	6034 \pm 576	4826 \pm 802		7588 \pm 1064	6315 \pm 855		7708 \pm 699	8482 \pm 1374		7101 \pm 586	5110 \pm 680 †	
Sol	5622 \pm 731	3243 \pm 615 †		4223 \pm 905	2522 \pm 246		4133 \pm 340	4563 \pm 768		4159 \pm 305	1735 \pm 661 †	
IFM/SSM												

Gas - Gastrocnemius; Sol - Soleus; IFM - Interfibrilläre Mitochondrien; SSM - Subsarcolemmale Mitochondrien

Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein; † p < 0,05; ‡ p < 0,001

Literaturverzeichnis

1. **Ananthakrishnan et al. 2005** ANANTHAKRISHNAN, R. ; MOE, G.W. ; GOLDENTHAL, M.J. ; MARIN-GARCIA, J.: Akt signaling pathway in pacing-induced heart failure. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 268 (2005), S. 103–110
2. **Bradford 1976** BRADFORD, M.M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254
3. **Bugger et al. 2010** BUGGER, H. ; SCHWARZER, M. ; CHEN, D. ; SCHREPPER, A. ; AMORIM, P. A. ; SCHOEPE, M. ; NGUYEN, T. D. ; MOHR, F. W. ; WEIMER, B. C. ; DOENST, T.: Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. In: *Cardiovascular Research* 85 (2010), S. 376–84
4. **Cavallero et al. 2007** CAVALLERO, S. ; GONZÁLEZ, G.E. ; PUYÓ, A.M. ; ROSÓN, M.I. ; PÉREZ, S. ; MORALES, C. ; HERTIG, C.M. ; GELPI, R.J. ; FERNÁNDEZ, B.E.: Atrial natriuretic peptide behaviour and myocyte hypertrophic profile in combined pressure and volume-induced cardiac hypertrophy. In: *Journal of Hypertension* 25 (2007), S. 1940–1950
5. **Chance u. Williams 1955** CHANCE, B. ; WILLIAMS, G.R.: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The respiratory chain. In: *Journal of Biological Chemistry* 217 (1955), S. 429–38
6. **Chemnitius et al. 1988** CHEMNITIUS, J.M. ; HÄFNER, P. ; KREUZER, H. ; ZECH, R.: Latent and free citrate synthase activity as enzymatic indicators for respiratory potential of isolated porcine heart mitochondria. In: *Journal of Applied Cardiology* 3 (1988), S. 301–310

7. **Chen et al. 2004** CHEN, C. ; KO, Y. ; DELANNOY, M. ; LUDTKE, S.J. ; CHIU, W. ; PEDERSEN, P.L.: Mitochondrial ATP synthasome: three dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP ATP. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), S. 31761–8
8. **Cheng et al. 2010** CHENG, Z. ; TSENG, Y. ; WHITE, M. F.: Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. In: *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21(10) (2010), S. 589–598
9. **Christe u. Rodgers 1994** CHRISTE, M. E. ; RODGERS, R. L.: Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26 (1994), S. 1371–1375
10. **Clark et al. 1953** CLARK, L. C. J. ; WOLF, R. ; GRANGER, D. ; TAYLOR, Z.: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. In: *Journal of Applied Physiology* 6 (1953), S. 189–193
11. **Dabkowski et al. 2009** DABKOWSKI, E. R. ; WILLIAMSON, C. L. ; BUKOWSKI, V. C. ; CHAPMAN, R. S. ; LEONARD, S. S. ; PEER, C. J. ; CALLERY, P. S. ; HOLLANDER, J. M.: Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 296 (2009), S. H359–69
12. **De Sousa et al. 2002** DE SOUSA, E. ; LECHENE, P. ; FORTIN, D. ; N'GUESSAN, B. ; BELMADANI, S. ; BIGARD, X. ; VEKSLER, V. ; VENTURA-CLAPIER, R.: Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity. In: *Cardiovascular Research* 56 (2002), S. 260–8
13. **De Sousa et al. 2000** DE SOUSA, E. ; VEKSLER, V. ; BIGARD, X. ; MATEO, P. ; VENTURA-CLAPIER, R.: Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. In: *Circulation* 102 (2000), S. 1847–53
14. **Dickstein et al. 2008** DICKSTEIN, K. ; COHEN-SOLAL, A. ; FILIPPATOS, G. ; McMURRAY, J. J. ; PONIKOWSKI, P. ; POOLE-WILSON, P. A. ; STROMBERG, A. ; VELDHUISEN, D. J. ; ATAR, D. ; HOES, A. W. ; KEREN, A. ; MEBAZAA, A. ; NIEMINEN, M. ; PRIORI, S. G. ; SWEDBERG, K. ; VAHANIAN, A. ; CAMM, J. ; DE CATERINA, R. ; DEAN, V. ; DICKSTEIN, K. ; FILIPPATOS, G. ; FUNCK-BRENTANO, C. ; HELLEMANS, I. ; KRISTENSEN, S. D. ; MCGREGOR, K. ; SECHTEM, U. ; SILBER, S. ; TENDERA, M. ;

- WIDIMSKY, P. ; ZAMORANO, J. L.: ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). In: *European Heart Journal* 29 (2008), S. 2388–442
15. **Doenst et al. 2010** DOENST, T. ; PYTEL, G. ; SCHREPPER, A. ; AMORIM, P. ; FARBER, G. ; SHINGU, Y. ; MOHR, F. W. ; SCHWARZER, M.: Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. In: *Cardiovascular Research* 86 (2010), S. 461–70
16. **Dorner u. Schultheiss 2000** DORNER, A. ; SCHULTHEISS, H. P.: The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. In: *Herz* 25 (2000), S. 176–80
17. **Drexler 1992** DREXLER, H.: Skeletal muscle failure in heart failure. In: *Circulation* 85 (1992), S. 1621–3
18. **Drexler et al. 1992** DREXLER, H. ; RIEDE, U. ; MUNZEL, T. ; KONIG, H. ; FUNKE, E. ; JUST, H.: Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. In: *Circulation* 85 (1992), S. 1751–9
19. **Dörner u. Schultheiss 2007** DÖRNER, A. ; SCHULTHEISS, H.P.: Adenine nucleotide translocase in the focus of cardiovascular diseases. In: *Trends in Cardiovascular Medicine*. 17 (2007), S. 284–90
20. **Estabrook 1967** ESTABROOK, R.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. In: *Methods in Enzymology* (1967), S. 41–47
21. **Falcão-Pires et al. 2010** FALCÃO-PIRES, I. ; GONÇALVES, N. ; GAVINA, C. ; PINHO, S. ; TEIXEIRA, T. ; MOURA, C. ; AMORIM, M.J. ; PINHO, P. ; AREIAS, J.C. ; LEITE-MOREIRA, A.: Correlation between plasma levels of apelin and myocardial hypertrophy in rats and humans: possible target for treatment? In: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 14 (2010), S. 231–241

22. **Finck u. Kelly 2007** FINCK, B. N. ; KELLY, D. P.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. In: *Circulation* 115 (2007), S. 2540–8
23. **Garnier et al. 2003** GARNIER, A. ; FORTIN, D. ; DELOMENIE, C. ; MOMKEN, I. ; VEKSLER, V. ; VENTURA-CLAPIER, R.: Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. In: *Journal of Physiology* 551 (2003), S. 491–501
24. **Garnier et al. 2005** GARNIER, A. ; FORTIN, D. ; ZOLL, J. ; N'GUESSAN, B. ; METTAUER, B. ; LAMPERT, E. ; VEKSLER, V. ; VENTURA-CLAPIER, R.: Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. In: *Faseb Journal* 19 (2005), S. 43–52
25. **Garnier et al. 2009** GARNIER, A. ; ZOLL, J. ; FORTIN, D. ; GUESSAN, B. ; LEFEBVRE, F. ; GENY, B. ; METTAUER, B. ; VEKSLER, V. ; VENTURA-CLAPIER, R.: Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. In: *Circulation. Heart failure* 2 (2009), S. 342–350
26. **Gillum 1993** GILLUM, R. F.: Epidemiology of heart failure in the United States. In: *American Heart Journal* 126 (1993), S. 1042–7
27. **Hackenbrock et al. 1986** HACKENBROCK, C.R. ; CHAZOTTE, B. ; GUPTE, S.S.: The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. In: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 18 (1986), S. 331–68
28. **Hambrecht et al. 1999** HAMBRECHT, R. ; ADAMS, V. ; GIELEN, S. ; LINKE, A. ; MOBIUS-WINKLER, S. ; YU, J. ; NIEBAUER, J. ; JIANG, H. ; FIEHN, E. ; SCHULER, G.: Exercise intolerance in patients with chronic heart failure and increased expression of inducible nitric oxide synthase in the skeletal muscle. In: *American College of Cardiology* 33 (1999), S. 174–179
29. **Heather et al. 2010** HEATHER, L. C. ; CARR, C. A. ; STUCKEY, D. J. ; POPE, S. ; MORTEN, K. J. ; CARTER, E. E. ; EDWARDS, L. M. ; CLARKE, K.: Critical role of complex III in the early metabolic changes following myocardial infarction. In: *Cardiovascular Research* 85 (2010), S. 127–36

- 30. **Heineke u. Molkentin 2006** HEINEKE, J. ; MOLKENTIN, J.D.: Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2006), S. 589–600
- 31. **ten Hove u. Neubauer 2007** HOVE, M. ten ; NEUBAUER, S.: MR spectroscopy in heart failure—clinical and experimental findings. In: *Heart Failure Reviews* 12 (2007), S. 48–57
- 32. **Huss et al. 2004** HUSS, J. M. ; TORRA, I. P. ; STAELS, B. ; GIGUERE, V. ; KELLY, D. P.: Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (2004), S. 9079–91
- 33. **Ide et al. 2001** IDE, T. ; TSUTSUI, H. ; HAYASHIDANI, S. ; KANG, D. ; SUEMATSU, N. ; NAKAMURA, K. ; UTSUMI, H. ; HAMASAKI, N. ; TAKESHITA, A.: Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. In: *Circulation Research* 88 (2001), S. 529–35
- 34. **Ingwall u. Weiss 2004** INGWALL, J. S. ; WEISS, R. G.: Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. In: *Circulation research* 95 (2004), S. 135–145
- 35. **Iossa et al. 2004** IOSSA, S. ; MOLLIKA, M. P. ; LIONETTI, L. ; CRESCENZO, R. ; TASSO, R. ; LIVERINI, G.: A possible link between skeletal muscle mitochondrial efficiency and age-induced insulin resistance. In: *Diabetes* 53 (2004), S. 2861–6
- 36. **Janssen et al. 2007** JANSSEN, A.J. ; TRIJBELS, F.J. ; SENGERS, R.C. ; SMEITINK, J.A. ; HEUVEL, L.P. van d. ; WINTJES, L.T. ; STOLTENBORG-HOGENKAMP, B.J. ; RODENBURG, R.J.: Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. In: *Clinical Chemistry* 53 (2007), S. 729–34
- 37. **Kannel 2000** KANNEL, W. B.: Incidence and epidemiology of heart failure. In: *Heart Failure Reviews* 5 (2000), S. 167–73
- 38. **Katz 2006** KATZ, A.M.: *Physiology of the heart*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006
- 39. **Kelly u. Scarpulla 2004** KELLY, D.P. ; SCARPULLA, R.C.: Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. In: *Genes & Development* 18 (2004), S. 357–68

40. **Kenchaiiah et al. 2002** KENCHIAIAH, S. ; EVANS, J. C. ; LEVY, D. ; WILSON, P. W. ; BENJAMIN, E. J. ; LARSON, M. G. ; KANNEL, W. B. ; VASAN, R. S.: Obesity and the risk of heart failure. In: *New England Journal of Medicine* 347 (2002), S. 305–13
41. **Kenchaiiah et al. 2004** KENCHIAIAH, S. ; NARULA, J. ; VASAN, R. S.: Risk factors for heart failure. In: *Medical Clinics of North America* 88 (2004), S. 1145–72
42. **Kindo et al. 2012** KINDO, M. ; GERELLI, S. ; BOUITBIR, J. ; CHARLES, A.L. ; ZOLL, J. ; HOANG MINH, T. ; MONASSIER, L. ; FAVRET, F. ; PIQUARD, F. ; GENY, B.: Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. In: *Frontiers in Physiology*. 3 (2012)
43. **Knutti u. Kralli 2001** KNUTTI, D. ; KRALLI, A.: PGC-1, a versatile coactivator. In: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12 (2001), S. 360–5
44. **Krahenbuhl et al. 1991** KRAHENBUHL, S. ; CHANG, M. ; BRASS, E. P. ; HOPPEL, C. L.: Decreased activities of ubiquinol:ferricytochrome c oxidoreductase (complex III) and ferrocytochrome c: oxygen oxidoreductase (complex IV) in liver mitochondria from rats with hydroxycobalamin[c-lactam]-induced methylmalonic aciduria. In: *The Journal of Biological Chemistry* 266 (1991), S. 20998–1003
45. **Krieger et al. 1980** KRIEGER, D. A. ; TATE, C. A. ; MCMILLIN-WOOD, J. ; BOOTH, F. W.: Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. In: *Journal of Applied Physiology* 48 (1980), S. 23–8
46. **Lehninger 1951** LEHNINGER, A. L.: Phosphorylation coupled to oxidation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide. In: *Journal of Biological Chemistry* 190 (1951), S. 345–59
47. **Levy et al. 1996** LEVY, D. ; LARSON, M. G. ; VASAN, R. S. ; KANNEL, W. B. ; HO, K. K.: The progression from hypertension to congestive heart failure. In: *Journal of the American Medical Association* 275 (1996), S. 1557–62
48. **Libera et al. 2009** LIBERA, L. D. ; RAVARA, B. ; GOBBO, V. ; BETTO, D. D. ; GERMINARIO, E. ; ANGELINI, A. ; EVANGELISTA, S. ; VESCOVO, G.: Skeletal muscle proteins oxidation in chronic right heart failure in rats: Can different beta-blockers prevent it to the same degree? In: *International Journal of Cardiology* (2009)

49. **Libera et al. 1999** LIBERA, L. D. ; ZENNARO, R. ; SANDRI, M. ; AMBROSIO, G. B. ; VESCOVO, G.: Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. In: *American Journal of Physiology* 277 (1999), S. C982–6
50. **Lloyd-Jones et al. 2002** LLOYD-JONES, D. M. ; LARSON, M. G. ; LEIP, E. P. ; BEISER, A. ; D'AGOSTINO, R. B. ; KANNEL, W.B. ; MURABITO, J. M. ; VASAN, R. S. ; BENJAMIN, E. J. ; LEVY, D.: Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. In: *Circulation* 106 (2002), S. 3068–72
51. **Lunde et al. 2006** LUNDE, P. K. ; SEJERSTED, O. M. ; THORUD, H. M. ; TONNESSEN, T. ; HENRIKSEN, U. L. ; CHRISTENSEN, G. ; WESTERBLAD, H. ; BRUTON, J.: Effects of congestive heart failure on Ca²⁺ handling in skeletal muscle during fatigue. In: *Circulation Research* 98 (2006), S. 1514–9
52. **Mancini et al. 1989** MANCINI, D. M. ; COYLE, E. ; COGGAN, A. ; BELTZ, J. ; FERRARO, N. ; MONTAIN, S. ; WILSON, J. R.: Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. In: *Circulation* 80 (1989), S. 1338–46
53. **Mancini et al. 1992** MANCINI, D. M. ; WALTER, G. ; REICHEK, N. ; LENKINSKI, R. ; MCCULLY, K. K. ; MULLEN, J. L. ; WILSON, J. R.: Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. In: *Circulation* 85 (1992), S. 1364–73
54. **Marin-Garcia et al. 1997** MARIN-GARCIA, J. ; ANANTHAKRISHNAN, R. ; GOLDENTHAL, M. J.: Mitochondrial gene expression in rat heart and liver during growth and development. In: *Biochemistry and Cell Biology* 75 (1997), S. 137–42
55. **Marin-Garcia et al. 2001** MARIN-GARCIA, J. ; GOLDENTHAL, M. J. ; MOE, G. W.: Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. In: *Cardiovascular Research* 52 (2001), S. 103–10
56. **Massie et al. 1995** MASSIE, B. M. ; SCHAEFER, S. ; GARCIA, J. ; MCKIRNAN, M. D. ; SCHWARTZ, G. G. ; WISNESKI, J. A. ; WEINER, M. W. ; WHITE, F. C.: Myocardial high-energy phosphate and substrate metabolism in swine with moderate left ventricular hypertrophy. In: *Circulation* 91 (1995), S. 1814–1823

57. **Maurer u. Ziers 1992** MAURER, I. ; ZIERS, S.: Positive correlation between aortic valve pressure gradient and mitochondrial respiratory chain capacity in hypertrophied human left ventricle. In: *Clinical Investigation* 70 (1992), S. 896–901
58. **Mettauer et al. 2001** METTAUER, B. ; ZOLL, J. ; SANCHEZ, H. ; LAMPERT, E. ; RIBERA, F. ; VEKSLER, V. ; BIGARD, X. ; MATEO, P. ; EPAILLY, E. ; LONSDORFER, J. ; VENTURA-CLAPIER, R.: Oxidative capacity of skeletal muscle in heart failure patients versus sedentary or active control subjects. In: *Journal of the American College of Cardiology* 38 (2001), S. 947–54
59. **Momken et al. 2003** MOMKEN, I. ; KAHAPIP, J. ; BAHI, L. ; BADOUAL, T. ; HITTINGER, L. ; VENTURA-CLAPIER, R. ; VEKSLER, V.: Does angiotensin-converting enzyme inhibition improve the energetic status of cardiac and skeletal muscles in heart failure induced by aortic stenosis in rats? In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35 (2003), S. 399–407
60. **Mootha et al. 2004** MOOTHA, V. K. ; HANDSCHIN, C. ; ARLOW, D. ; XIE, X. ; ST PIERRE, J. ; SIHAG, S. ; YANG, W. ; ALTSHULER, D. ; PUIGSERVER, P. ; PATTERSON, N. ; WILLY, P. J. ; SCHULMAN, I. G. ; HEYMAN, R. A. ; LANDER, E. S. ; SPIEGELMAN, B. M.: Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (2004), S. 6570–5
61. **Nemoto et al. 2005** NEMOTO, S. ; FERGUSON, M.M. ; FINKEL, T.: SirT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1alpha. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), S. 16456–60
62. **Neubauer 2007** NEUBAUER, S.: The failing heart - an engine out of fuel. In: *New England Journal of Medicine* 356 (2007), S. 1140–1151
63. **Neubauer et al. 1997** NEUBAUER, S. ; HORN, M. ; CRAMER, M. ; HARRE, K. ; NEWELL, J. B. ; PETERS, W. ; PABST, T. ; ERTL, G. ; HAHN, D. ; INGWALL, J. S. ; KOCHSIEK, K.: Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. In: *Circulation* 96 (1997), S. 2190–2196
64. **Palmer et al. 1977** PALMER, J. W. ; TANDLER, B. ; HOPPEL, C. L.: Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. In: *Journal of Biological Chemistry* 252 (1977), S. 8731–9

65. **Puigserver u. Spiegelman 2003** PUIGSERVER, P. ; SPIEGELMAN, B.M.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. In: *Endocrine Reviews*. 24 (2003), S. 78–90
66. **Quigley et al. 2000** QUIGLEY, A. F. ; KAPSA, R. M. ; ESMORE, D. ; HALE, G. ; BYRNE, E.: Mitochondrial respiratory chain activity in idiopathic dilated cardiomyopathy. In: *Journal of Cardiac Failure* 6 (2000), S. 47–55
67. **Rimbaud et al. 2009** RIMBAUD, S. ; GARNIER, A. ; VENTURA-CLAPIER, R.: Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. In: *Pharmacological reports* 61 (2009), S. 131–138
68. **Riva et al. 2005** RIVA, A. ; TANDLER, B. ; LOFFREDO, F. ; VAZQUEZ, E. ; HOPPEL, C.: Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 289 (2005), S. H868–72
69. **Rosca u. Hoppel 2009** ROSCA, M. G. ; HOPPEL, C. L.: New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. In: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41 (2009), S. 107–12
70. **Rosca et al. 2009** ROSCA, M. G. ; OKERE, I. A. ; SHARMA, N. ; STANLEY, W. C. ; RECCHIA, F. A. ; HOPPEL, C. L.: Altered expression of the adenine nucleotide translocase isoforms and decreased ATP synthase activity in skeletal muscle mitochondria in heart failure. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46 (2009), S. 927–35
71. **Rosca et al. 2008** ROSCA, M. G. ; VAZQUEZ, E. J. ; KERNER, J. ; PARLAND, W. ; CHANDLER, M. P. ; STANLEY, W. ; SABBAH, H. N. ; HOPPEL, C. L.: Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. In: *Cardiovascular Research* 80 (2008), S. 30–9
72. **Sack et al. 1996** SACK, M. N. ; RADER, T. A. ; PARK, S. ; BASTIN, J. ; MCCUNE, S. A. ; KELLY, D. P.: Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. In: *Circulation* 94 (1996), S. 2837–42

73. **Sasayama et al. 1976** SASAYAMA, S. ; ROSS JR, J. ; FRANKLIN, D. ; BLOOR, C. M. ; BISHOP, S. ; DILLEY, R. B.: Adaptations of the left ventricle to chronic pressure overload. In: *Circulation Research* 38 (1976), S. 172–8
74. **Scarpulla 2006** SCARPULLA, R. C.: Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (2006), S. 673–83
75. **Schagger u. Pfeiffer 2000** SCHAGGER, H. ; PFEIFFER, K.: Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. In: *EMBO Journal* 19 (2000), S. 1777–83
76. **Schreiber et al. 2004** SCHREIBER, S.N. ; EMTER, R. ; HOCK, M.B. ; KNUTTI, D. ; CARDENAS, J. ; PODVINEC, M. ; OAKELEY, E.J. ; KRALLI, A.: The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (2004), S. 6472–7
77. **Schulze et al. 2003** SCHULZE, P. C. ; KRATZSCH, J. ; LINKE, A. ; SCHOENE, N. ; ADAMS, V. ; GIELEN, S. ; ERBS, S. ; MOEBIUS-WINKLER, S. ; SCHULER, G.: Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. In: *European Journal of Heart Failure* 5 (2003), S. 33–40
78. **Schwarzer et al. 2010** SCHWARZER, M. ; NGUYEN, D. ; HAIN, C. ; AMORIM, P. A. ; BLUM, D. ; SCHREPPER, A. ; DOENST, T.: Pressure overload causes PTP1B activation: a possible mechanism for heart failure associated insulin resistance. In: *Circulation* 122 (2010), S. A15431
79. **Schwarzer et al. 2012** SCHWARZER, M. ; NGUYEN, T. ; SCHREPPER, A. ; AMORIM, P.A. ; MUEHLE, A. ; FAERBER, G. ; DOENST, T.: Pressure Overload Causes PTP1B Activation: a Possible Mechanism for Heart Failure Associated Insulin Resistance in Rats and Humans. In: *in Preparation* (2012)
80. **Sebastiani et al. 2007** SEBASTIANI, M. ; GIORDANO, C. ; NEDIANI, C. ; TRAVAGLINI, C. ; BORCHI, E. ; ZANI, M. ; FECCIA, M. ; MANCINI, M. ; PETROZZA, V. ; COSSARIZZA, A. ; GALLO, P. ; TAYLOR, RW. ; D'AMATI, G.: Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50 (2007), S. 1362–1369

81. **Shimizu et al. 2010** SHIMIZU, I. ; MINAMINO, T. ; TOKO, H. ; OKADA, S. ; IKEDA, H. ; YASUDA, N. ; TATENO, K. ; MORIYA, J. ; YOKOYAMA, M. ; NOJIMA, A. ; KOH, G.Y. ; AKAZAWA, H. ; SHIOJIMA, I. ; KAHN, C.R. ; ABEL, E.D. ; KOMURO, I.: Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. In: *Journal of clinical investigation* 120 (2010), S. 1506–14
82. **Simonini et al. 1996a** SIMONINI, A. ; LONG, C. S. ; DUDLEY, G. A. ; YUE, P. ; McELHINNY, J. ; MASSIE, B. M.: Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. In: *Circulation Research* 79 (1996), S. 128–36
83. **Simonini et al. 1996b** SIMONINI, A. ; MASSIE, B. M. ; LONG, C. S. ; QI, M. ; SAMAREL, A. M.: Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28 (1996), S. 1683–91
84. **Sink et al. 1981** SINK, J.D. ; PELLOM, G.L. ; CURRIE, W.D. ; HILL, R.C. ; OLSEN, C.O. ; JONES, R.N. ; WECHSLER, A.S.: Response of hypertrophied myocardium to ischemia: correlation with biochemical and physiological parameters. In: *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 81 (1981), S. 865–72
85. **Sonntag et al. 2012** SONNTAG, A.G. ; DALLE PEZZE, P. ; SHANLEY, D.P. ; THEDIECK, K.: A modelling experimental approach reveals insulin receptor substrate (IRS)-dependent regulation of adenosine monophosphate-dependent kinase (AMPK) by insulin. In: *The FEBS Journal*. 279 (2012), S. 3314–28
86. **Sparagna et al. 2007** SPARAGNA, G. C. ; CHICCO, A. J. ; MURPHY, R. C. ; BRISTOW, M. R. ; JOHNSON, C. A. ; REES, M. L. ; MAXEY, M. L. ; McCUNE, S. A. ; MOORE, R. L.: Loss of cardiac tetralinoleoyl cardiolipin in human and experimental heart failure. In: *Journal of Lipid Research* 48 (2007), S. 7
87. **Srere 1969** SRERE, P.: Citrate Synthase. In: *Methods in Enzymology* 13 (1969), S. 3–11
88. **Sullivan et al. 1990** SULLIVAN, M. J. ; GREEN, H. J. ; COBB, F. R.: Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. In: *Circulation* 81 (1990), S. 518–27
89. **Taegtmeyer 1994** TAEGTMEYER, H.: Energy metabolism of the heart: From basic concepts to clinical applications. In: *Current Problems in Cardiology* 19 (1994), S. 57–116

90. **Teerlink u. Clozel 1993** TEERLINK, J. R. ; CLOZEL, J. P.: Hemodynamic variability and circadian rhythm in rats with heart failure: role of locomotor activity. In: *American Journal of Physiology* 264 (1993), S. H2111–8
91. **Turner u. Heilbronn 2008** TURNER, N. ; HEILBRONN, L.: Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? In: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19 (2008), S. 324–30
92. **Van Berendoncks et al. 2010** VAN BERENDONCKX, A. ; GARNIER, A. ; BECKERS, P. ; HOYMANS, V. Y. ; POSSEMIERS, N. ; FORTIN, D. ; MARTINET, W. ; VAN HOOF, V. ; VRINTS, C. J. ; VENTURA-CLAPIER, R. ; CONRAADS, V. M.: Functional adiponectin resistance at the level of the skeletal muscle in mild to moderate chronic heart failure. In: *Circulation. Heart failure* 3 (2010), S. 185–194
93. **Vescovo et al. 1998** VESCOVO, G. ; CECONI, C. ; BERNOCCHI, P. ; FERRARI, R. ; CARRARO, U. ; AMBROSIO, G. B. ; LIBERA, L. D.: Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. In: *Cardiovascular Research* 39 (1998), S. 233–41
94. **Weinstein et al. 1985** WEINSTEIN, E.S. ; BENSON, D.W. ; RATCLIFFE, D.J. ; MAKSEM, J. ; FRY, D.E.: Experimental myocardial ischemia. Differential injury of mitochondrial subpopulations. In: *Archives of Surgery* 120 (1985), S. 332–8
95. **Wharton u. Tzagoloff 1967** WHARTON, D. C. ; TZAGOLOFF, A.: Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. In: *Methods in Enzymology* 10 (1967), S. 245–250
96. **Witte et al. 2000** WITTE, K. ; HU, K. ; SWIATEK, J. ; MUSSIG, C. ; ERTL, G. ; LEMMER, B.: Experimental heart failure in rats: effects on cardiovascular circadian rhythms and on myocardial beta-adrenergic signaling. In: *Cardiovascular Research* 47 (2000), S. 350–8
97. **Wittig et al. 2006** WITTIG, I. ; BRAUN, H.P. ; H., Schagger: Blue native PAGE. In: *Nature Protocols* 1 (2006), S. 418–428
98. **Wu et al. 1999** WU, Z. ; PUIGSERVER, P. ; ANDERSSON, U. ; ZHANG, C. ; ADELMANT, G. ; MOOTHA, V. ; TROY, A. ; CINTI, S. ; LOWELL, B. ; SCARPULLA, R. C. ; SPIEGELMAN, B. M.: Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. In: *Cell* 98 (1999), S. 115–24

99. **Zoll et al. 2006** ZOLL, J. ; MONASSIER, L. ; GARNIER, A. ; N'GUESSAN, B. ; METTAUER, B. ; VEKSLER, V. ; PIQUARD, F. ; VENTURA-CLAPIER, R. ; GENY, B.: ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. In: *Journal of Applied Physiology* 101 (2006), S. 385–91

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Arzneimittel	19
2	Pipettierschema für die Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität	25
3	Substratzugabe	30
4	Pufferlösungen	32
5	PCR Reaktionsansatz	37
6	Nukleotidsequenzen der entworfenen Vorwärts- und Rückwärts-Primer . . .	41
7	Morphometrische Parameter	44
8	Parameter zur Klassifizierung der Herzfunktion	47
9	Muskelgewichte	50
10	Proteingehalt	51
11	Citratsynthase-Aktivität im Herz- und Skelettmuskel	53
12	Citratsynthase-Quotient isolierter Mitochondrien	55
13	State 4 Atmung isolierter Mitochondrien	65
14	ADP/O Quotient isolierter Mitochondrien	68
15	Enzymaktivität des Atmungskettenkomplexes I	96
16	Enzymaktivität des Atmungskettenkomplexes II	97
17	Enzymaktivität des Atmungskettenkomplexes III	98
18	Enzymaktivität des Atmungskettenkomplexes IV	99

Abbildungsverzeichnis

1	Mitochondrium - Aufbau	11
2	Mitochondrien - Lage	11
3	Atmungskette	13
4	Aortenzügelung	19
5	Aortenzügelung - Foto	19
6	Mitochondrienisolation	23
7	Aufbau der verwendeten Atmungskammer	26
8	Verlauf der Atmungskurve	30
9	Bestimmung der Aktivität des Komplexes I	33
10	Bestimmung der Aktivität des Komplexes II	33
11	Bestimmung der Aktivität des Komplexes III	34
12	Bestimmung der Aktivität des Komplexes IV	34
13	Relative morphologische Parameter	45
14	Echokardiografische Untersuchung	46
15	Echokardiografische Parameter	48
16	Atrophieindex	49
17	Mitochondriale Ausbeute	55
18	State 3 Atmung Herz	58
19	State 3 Atmung Gastrocnemius	59
20	State 3 Atmung Soleus	60
21	DNP-stimulierte Atmung (Substrat Glutamat)	62
22	DNP-stimulierte Atmung (Substrat Succinat)	63
23	Relative Aktivität der individuellen Atmungskettenkomplexe - Herz	69
24	Relative Aktivität der individuellen Atmungskettenkomplexe - Gastrocnemius	69

25	Relative Aktivität der individuellen Atmungskettenkomplexe - Soleus . . .	70
26	Relative mRNA Expression einzelner Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette	72
27	Relative mRNA Expression - ANT	73
28	Relative Proteinexpression einzelner Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette	75
29	BN-PAGE	77
30	Expression des Superkomplexes C1CIII ₂ CIV	77
31	Durchflusszytometrie	79
32	Relative mRNA-Expression verschiedener Schlüsselgene der mitochondrialen Biogenese	81
33	Kardiale Entwicklung	84
34	Verlauf respiratorische Kapazität	86

Eigene Publikationen

1. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, **Schrepper A**, Amorim PA, Schoepe M, Nguyen TD, Mohr FW, Khalimonchuk O, Weimer BC, Doenst T - Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovascular Research* 2010; 85(2):376-84
2. Doenst T, Pytel G, **Schrepper A**, Amorim PA, Färber G, Shingu Y, Mohr FW, Schwarzer M - Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovascular Research* 2010; 86(3):461-70.
3. Faerber G, Barreto-Perreia F, Schoepe M, Gilsbach R, **Schrepper A**, Schwarzer M, Mohr FW, Hein L, Doenst T - Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: Reduced peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2010
4. Amorim PA, Nguyen TD, Shingu Y, Schwarzer M, Mohr FW, **Schrepper A**, Doenst T - Myocardial infarction in rats causes partial impairment in insulin response associated with reduced fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2010; 140(5):1160-7.
5. Schoepe M¹, **Schrepper A**¹, Schwarzer M, Osterholt M, Doenst T - Exercise Can Induce Temporary Mitochondrial and Contractile Dysfunction Linked to Impaired Respiratory Chain Complex Activity. *Metabolism* 2012; 61(1):117-26.
¹ Doppelte Erstautorenschaft
6. **Schrepper A**, Schwarzer M, Schoepe M, Amorim PA, Doenst T - Biphasic Response of Skeletal Muscle Mitochondria to Chronic Cardiac Pressure Overload - Role of Respiratory Chain Complex Activity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012; 52(1):125-35.
7. Sossdorf M, Fischer J, Meyer S, Dahlke K, Wissuwa B, **Schrepper A**, Bockmeyer CL, Lupp A, Neugebauer S, Schmerler D, Rödel J, Claus RA, Otto GP - Physical exercise induces systemic adaptations resulting in reduced organ injury and mortality during severe polymicrobial sepsis. *Critical Care Medicine* 2013 Jul 24.

8. Schwarzer M, **Schrepper A**, Amorim PA, Doenst T - Pressure Overload Differentially Affects Respiratory Capacity in Interfibrillar and Subsarcolemmal Mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2013; 304(4):H529-37.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Freunden und Kollegen bedanken, die mir während der Promotionszeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere geht mein Dank an:

Meine Familie, Frank, Carola und Thomas, für ihre Unterstützung und das daran Glauben.

Prof. Dr. Torsten Doenst für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen und seine wissenschaftliche Betreuung.

Dr. Michael Schwarzer für seine Kollegialität und Freundschaft, das Unterstützen bei schwierigen Fragen und für unsere fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden/Kollegen Anja Köppen, Maria Schöpe, Claudia Weiß, Daniel Blum und Christian Jäger bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Andrea Schrepper, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Torsten Doerst, Dr.rer.nat Michael Schwarzer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Schkopau, den 13. Februar 2013